

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL
IMMUNEPOTENT CRP® EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA Y
SU EFECTO EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA O EPIRUBICINA**

POR

OLGA LILIANA GUZMÁN AGUILLÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INMUNOBIOLOGÍA**

MARZO, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL
IMMUNEPOTENT CRP® EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA Y
SU EFECTO EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA O EPIRUBICINA**

POR

OLGA LILIANA GUZMÁN AGUILLÓN

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INMUNOBIOLOGÍA**

MARZO, 2018

**ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL
IMMUNEPOTENT CRP® EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA Y
SU EFECTO EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA O EPIRUBICINA**

Comité de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla.
Presidente

Dra. Ana Carolina Martínez Torres.
Secretario

Dr. Edgar Mendoza Gamboa.
1° Vocal

Dr. Pablo Zapata Benavides
2° Vocal

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales.
3° Vocal

**ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL
IMMUNEPOTENT CRP® EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA Y
SU EFECTO EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA O EPIRUBICINA**

Dirección de Tesis

Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Director de Tesis



Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Laboratorio de Inmunología y Virología por brindarme el apoyo económico y la infraestructura para realizar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero dar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, porque además de abrirme las puertas a este lugar brindandome una oportunidad de realización profesional, abrió las puertas también, a una nueva experiencia en donde encontraría un crecimiento personal y espiritual, que transformaría mi vida y mi relación personal con Dios. Agradezco su incondicional apoyo, para que todo esto ocurriera: gracias por su tiempo sin citas, por los materiales requeridos, por sus intervenciones en tiempos difíciles, por escucharme, por acceder a darme un empleo en la clínica para permitir concluir esta tesis, por ser tan agradable a pesar del exceso de trabajo, y por transmitirme siempre tranquilidad y seguridad; no conforme, además, agradezco que sea una persona de fé y un instrumento de Dios en sus maravillosos planes, que contribuyeron fervientemente para que mi fe creciera, y se fortaleciera, al mismo tiempo que me desarrollaba profesionalmente, siendo este quizás, el mayor de los logros durante este tiempo. Agradezco a Dios todas las experiencias y personas, que formaron parte de esta travesía, y este bonito lugar que me ha dejado tanto. Gracias de nuevo, Dios la bendiga siempre, y permita que llegue a más personas como a mí.

Gracias a la Dra. Ana Carolina Martínez, por aceptarme en su laboratorio y confiar en mis capacidades para culminar esta tesis. Siempre admiraré su espíritu de docencia y servicio hacia los estudiantes; agradezco el tiempo, talentos y conocimientos en pro del cumplimiento de nuestras metas profesionales, siempre con un nivel de excelencia; además de su interés sincero por escucharme, comprenderme y ayudarme en muchas situaciones, no sólo en lo profesional, sino también en lo personal. Gracias por procurarnos siempre un ambiente de trabajo en armonía, orden y equidad; por enseñarme también, lo importante del trabajo en equipo y de las relaciones profesionales, siendo un gran ejemplo, al ser una líder manejando este laboratorio. Gracias por la asesoría y los consejos durante mi paso por el laboratorio, pude ver que es una gran persona, de la cual aprendí mucho.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio: Luis, Ashanti, Kenny, Abbi, Alan, Karla, Mile, Andrea, Martín, Helen, Myrna, y a los recién llegados: Ale, Sergio, Claudia y Adal;

por darme la bienvenida, compartir conmigo su espacio de trabajo, y hacer del trabajo experimental más llevadero y ameno; gracias por tener siempre una buena actitud a pesar de los malentendidos. Quiero mencionar especialmente a Michel, por haber sido de gran ayuda justo cuando más lo necesita, ayudándome a concluir en el poco tiempo que tenía los experimentos necesarios para el seminario final, sin tu ayuda, no hubiera podido concluirlo; gracias por tener la cualidad de responsabilidad, disponibilidad y servicio que se requería para aprender y llevar los experimentos a cabo de manera pronta y correcta, a pesar de solo estar en segundo semestre de la carrera.

Quiero agradecer también a quienes me recibieron en un inicio y me enseñaron las técnicas de cultivo celular, entre muchas otras cosas, cuando todo era nuevo y muy complicado para mí, gracias a: Carmen, Yaris y Erika.

Agradezco también, al resto de mi comité: Dr. Edgar Gamboa Mendoza, Dr. Pablo Zapata y Dra. Lydia Morales Rivera, por ayudarme de alguna u otra manera, ya sea con material, papelería, clases, consejos, preguntas, recomendaciones e incluso mensajes de ánimo durante el trayecto de este viaje. Todos ellos contribuyeron y fueron parte clave de la culminación de esta tesis.

Finalmente, agradezco al Dr. Moisés Armides Franco Molina, por hablarme del Immunepotent CRP y sembrar en mí la curiosidad que llevo a realizar esta obra, animándome a realizar la maestría.

DEDICATORIA

A Dios, por sus maravillosos planes. Por obrar para bien incluso en nuestras malas decisiones y por ser un padre de segundas oportunidades.

A Daniel mi esposo, y a Christian mi hijo por su siempre apoyo y comprensión.

*A mis Padres por enseñarme a no conformarme y luchar para alcanzar mis sueños.
Pero especialmente a mi suegra y mi amiga, la Sra. Rebecca, por ayudarme al día a día,
a completar esta meta.*

INDICE

Capítulo	Página
I. RESUMEN.....	XVI
II. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. Cáncer	3
1.1 Aspectos Generales	3
1.2 Origen y desarrollo de células cancerígenas	4
2. Cáncer de mama.....	6
2.1 Anatomía y origen de las lesiones por cáncer de mama	6
2.2 Lesiones malignas del tejido mamario: clasificación convencional y molecular	9
2.3 Subtipos moleculares de cáncer de mama.....	9
2.4 Diagnóstico	15
2.5 Estadificación.....	15
2.6 Pronóstico.....	17
2.7 Tratamiento	18
3. Tratamiento adyuvante contra cáncer	21
3.1 Epirubicina	23
3.3 Ciclofosfamida	27
4. IMMUNEPOTENT CRP	29
5. Terapia Múltiple e interacción farmacológica	31
1. JUSTIFICACIÓN	37
2. HIPÓTESIS.....	38
3. OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo General	39
5.2 Objetivos Particulares	39
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
4.1 Mantenimiento de las líneas celulares	40
4.2 Elaboración de IMMUNEPOTENT CRP	40

4.3 Quimioterapia.....	41
4.4 Cálculo de la relación dosis-respuesta de los tratamientos	41
4.5 Determinación y cuantificación de sinergismo, aditivismo o antagonismo.....	43
4.6 Diseño de combinaciones.....	43
4.8 Análisis por citometría de flujo.....	44
4.8.1 Análisis de muerte celular en MCF-7 y MDA-MB-231.	45
4.8.2 Evaluación de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial.....	46
4.8.3 Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	47
4.9 Análisis estadísticos	47
5. RESULTADOS	48
5.1 El I-CRP ejerce un efecto antitumoral en células MCF-7; así como también, en células MDA-MB-231 “triple negativo” de cáncer de mama.	48
5.2 El I-CRP induce estrés oxidativo en células MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.	49
5.3 El antioxidante N-acetilcisteína inhibe el estrés oxidativo inducido por el I-CRP en MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo.	50
5.4 La muerte celular causada por el I-CRP en células MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo” depende de la generación de ROS.	51
5.5 La epirubicina posee un efecto antitumoral, per se, sobre MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.	52
5.6 La ciclofosfamida posee un efecto antitumoral, per se, sobre MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.	53
5.7 Las respuestas dependientes de dosis de las células MCF-7 y MDA-MB-231 a los tratamientos siguen curvas no-rectas, debido a su comportamiento biológico.	54
5.8 Análisis de la combinación del I-CRP con epirubicina en líneas tumorales de cáncer de mama.	57
5.8.1 Concentraciones mínimas I-CRP incrementan sinérgicamente el efecto antitumoral de la epirubicina en MCF-7.	57
5.8.2 Concentraciones mínimas de I-CRP incrementan sinérgicamente el efecto antitumoral de la epirubicina en MDA-MB-231 “triple negativo”.	58
5.8.3 Concentraciones mínimas de I-CRP incrementan significativamente la muerte celular inducida por la epirubicina en MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.	60
5.9 Análisis de la combinación de la epirubicina con el Immunepotent-CRP.....	63
5.9.1 Concentraciones mínimas de epirubicina incrementan aditivamente el efecto antitumoral del I-CRP en MCF-7.....	63

5.9.2 Concentraciones mínimas de epirubicina incrementan sinérgicamente el efecto antitumoral del I-CRP en MDA-MB-231 “triple negativo”.....	64
5.9.3 Concentraciones mínimas de epirubicina incrementan la muerte celular inducida por el I-CRP de manera variable en MCF-7 y MDA-MB-231.	65
5.10 Análisis de la combinación de I-CRP&epirubicina, a concentraciones equipotentes, en MCF-7 y MDA-MB-231.....	68
5.11 Análisis de la combinación del I-CRP con ciclofosfamida en líneas tumorales de cáncer de mama.....	74
5.11.1 Concentraciones mínimas I-CRP incrementan aditivamente el efecto antitumoral de ciclofosfamida en MCF-7	74
5.11.2 Concentraciones mínimas I-CRP incrementan aditivamente el efecto antitumoral de ciclofosfamida en MDA-MB-231 “triple negativo”.	75
5.11.3 Concentraciones mínimas de I-CRP incrementan la muerte celular inducida por la ciclofosfamida, de manera variable en MCF-7 y MDA-MB-231.....	76
5.12 Análisis de la combinación de la ciclofosfamida con el Immunepotent-CRP.....	80
5.12.1 Concentraciones mínimas de ciclofosfamida incrementan aditivamente el efecto antitumoral del I-CRP en MCF-7.....	80
5.12.2 Concentraciones mínimas de ciclofosfamida incrementan aditivamente el efecto antitumoral del I-CRP en MDA-MB-231.	82
5.12.3 Concentraciones mínimas de ciclofosfamida incrementan la muerte celular inducida por el I-CRP, de manera variable en MCF-7 y MDA-MB-231.	83
5.13 Análisis de la combinación de I-CRP & ciclofosfamida a concentraciones equipotentes, en MCF-7 y MDA-MB-231.....	88
6. DISCUSIÓN	96
7. CONCLUSIONES	104
8. PERSPECTIVAS	107
9. BIBLIOGRAFÍA	108

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama.

Tabla 2. Características de los subtipos moleculares del cáncer de mama.

Tabla 3.- Estadios del cáncer de mama.

Tabla 4.- Quimioterapia utilizada en México contra el cáncer de mama.

Tabla 5.- Esquemas de tratamiento múltiple brindados en cáncer de mama.

Tabla 6.- Tratamiento adicional para pacientes con fenotipo Her2 (+).

Tabla 7. Cuantificación de sinergismo y antagonismo.

Tabla 8. Complicación de concentraciones inhibitorias de I-CRP, ciclofosfamida y epirubicina en MCF-7 y MDA-MB-231.

Tabla 9. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & epirubicina en células MCF-7, *in vitro*.

Tabla 10. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & epirubicina en células MDA-MB-231 “triple negativo”, *in vitro*.

Tabla 11. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & ciclofosfamida en células MCF-7, *in vitro*.

Tabla 12. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & ciclofosfamida en células MDA-MB-231, *in vitro*.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria y el tejido mamario.

Figura 2. Corte histológico de la unidad acino-conducto terminal del tejido mamario.

Figura 3. Células que conforman el tejido mamario y sus principales marcadores proteicos.

Figura 4. Drenaje linfático de la mama.

Figura 5. Líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231.

Figura 6. Morfología 2^{da}- y 3^{era}-dimensión e inmunotinción de LC3B de líneas celulares de cáncer de mama.

Figura 7. Producción de especies reactivas de oxígeno / nitrógeno inducidas por antraciclinas dentro del contexto celular.

Figura 8. Descripción de los cambios moleculares asociados con el desarrollo de cardiotoxicidad de antraciclinas.

Figura 9. Conversión enzimática de la resazurina a resorufina por células viables.

Figura 10. Efecto sobre la viabilidad y la muerte celular del tratamiento con I-CRP.

Figura 11. Daño mitocondrial e inducción de ROS por el I-CRP.

Figura 12. La N-acetilcisteína inhibe la generación de ROS dada por el I-CRP.

Figura 13. La N-acetilcisteína inhibe la muerte celular inducida por el I-CRP.

Figura 14. La epirubicina reduce la viabilidad e incrementa la muerte celular de MCF-7 y MDA-MB-231 de manera dependiente de dosis.

Figura 15. La ciclofosfamida reduce la viabilidad e incrementa la muerte celular de MCF-7 y MDA-MB-231 de manera dependiente de dosis.

Figura 16. Comportamiento fisicoquímico de MCF-7 frente a I-CRP, ciclofosfamida y epirubicina.

Figura 17. Comportamiento fisicoquímico de MDA-MB-231 frente a I-CRP, ciclofosfamida y epirubicina.

Figura 18. Efecto sinérgico del I-CRP sobre células MCF-7 tratadas con epirubicina.

Figura 19. Efecto sinérgico del I-CRP sobre células MDA-MB-231 tratadas con epirubicina.

Figura 20. El I-CRP incrementa la muerte celular inducida por la epirubicina.

Figura 21. Efecto aditivo de la epirubicina sobre células MCF-7 tratadas con I-CRP.

Figura 22. El I-CRP induce cambios en la morfología de muerte celular dado por la epirubicina.

Figura 23. Efecto aditivo de la epirubicina sobre células MDA-MB-231 tratadas con I-CRP.

Figura 24. La epirubicina incrementa la muerte celular inducida por el I-CRP.

Figura 25. La epirubicina induce cambios en la morfología de muerte celular dada por el I-CRP.

Figura 26. Dosis equipotentes de I-CRP y epirubicina en combinación incrementan la muerte de células de cáncer de mama.

Figura 27. Morfología de muerte celular dada por el tratamiento combinado de I-CRP y epirubicina en células de cáncer de mama.

Figura 28. Efecto aditivo del I-CRP sobre células MCF-7 tratadas con ciclofosfamida.

Figura 29. Efecto aditivo del I-CRP sobre células MDA-MB-231 tratadas con ciclofosfamida.

Figura 30. El I-CRP (IC_1) incrementa variablemente la muerte celular inducida por la ciclofosfamida en MCF-7.

Figura 31. El I-CRP induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la ciclofosfamida en MCF-7

Figura 32. El I-CRP (IC_1) incrementa significativamente la muerte celular inducida por la ciclofosfamida en MDA-MB-231 “triple negativo”.

Figura 33. El I-CRP induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la ciclofosfamida en células MDA-MB-231 “triple negativo”.

Figura 34. Efecto aditivo de la ciclofosfamida sobre células MCF-7 tratadas con I-CRP.

Figura 35. Efecto aditivo de la ciclofosfamida sobre células MDA-MB-231 tratadas con I-CRP.

Figura 36. La ciclofosfamida (IC_1) incrementa significativamente la muerte celular inducida por el I-CRP en células MCF-7.

Figura 37. La ciclofosfamida induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la el I-CRP en células MCD-7.

Figura 38. La ciclofosfamida (IC_1) no incrementa significativamente la muerte celular inducida por el I-CRP en células MDA-MB-231.

Figura 39. La ciclofosfamida no induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la el I-CRP en células MDA-MB-231.

Figura 40. Dosis equipotentes de I-CRP y ciclofosfamida en combinación incrementan la muerte de células de cancer de mama MCF-7.

Figura 41. Morfología de muerte celular dada por el tratamiento combinado de I-CRP y ciclofosfamida a dosis equipotentes en células de cáncer de mama MCF-7.

Figura 42. Dosis equipotentes de I-CRP y ciclofosfamida en combinación incrementan la muerte de células de cancer de mama MDA-MB-231.

Figura 43. Morfología de muerte celular dada por el tratamiento combinado de I-CRP y ciclofosfamida a dosis equipotentes en células de cáncer de mama MDA-MB-231.

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

AACR. - American Association of Cancer Research.

AJCC. - American Joint Committee on Cancer.

ASCO. - American Society of Clinical Oncology.

ASMR. - Rango de Mortalidad estandarizado por año, del inglés, Age-Standardized Mortality Rate.

bDLE. - Extracto dializable de leucocitos bovino.

BRAF. - B-Raf protein.

CC. – Concentración Citotóxica.

CDKN2A. - Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A.

CEF. – Régimen con ciclofosfamida, epirubicina y 5-fluoracilo en combinación.

CI. – Concentración Inhibitoria.

CSE. - Cuadrante Superior Externo.

CYC. - Ciclofosfamida.

DAMPs. - Damage-associated molecular patterns.

DMEM/F12.- Medio de eagle modificado por dulbecco/F12.

EGFR. - Epidermal growth factor receptor.

EPI. - Epirubicina.

FDA. - Food and Drug Administration.

5-FLU. - 5-fluorouracilo.

I CRP. - IMMUNEPOTENT CRP

IC. - Índice Combinacional.

IMSS. - Instituto Mexicano del Seguro Social.

ISSSTE. - Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores.

LC3B. - 1A/1B-light chain 3

MAP1LC3B. – Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta.

MDR.- Resistencia a multiple drogas.

NCCN. - National Comprehensive Cancer Network.

OMS. - Organización Mundial de la Salud.

pCR. - respuesta patológica completa.

PIK3CA. - Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha.

R^2 .- Coeficiente de determinación.

R.- Coeficiente de correlación de Pearson.

RE.- receptor de estrógeno.

ROR. – Puntación de Riesgo de Recurrencia.

RP. - receptor de progesterona.

RR. – Riesgo Relativo.

RS. – Puntaje de Recurrencia.

SLNB. - Biopsia del ganglio linfático centinela, del inglés, Sentinel Lymph Node Biopsy.

SPSS. - Statistical Package for the Social Sciences.

TNBC. - Triple Negative Breast Cancer.

TNM. - Tumor, Nódulo, Metástasis, del inglés, Tumor, Node, Mestastasis.

YAP1. - Yes-associated protein 1

I. RESUMEN

El cáncer de mama es la malignidad más común entre las mujeres a nivel mundial, así como una de las principales causas de muerte. Subtipos moleculares de cáncer de mama, como el “Triple Negativo” (TNBC), no cuenta actualmente con un tratamiento efectivo, al tiempo que la quimioterapia, único tratamiento existente, desarrolla farmacoresistencia. Se ha propuesto que la terapia combinacional pueda ofrecer grandes ventajas. El Immunepotent *CRP*® (I-CRP), un bDLE, ha demostrado clínicamente mielo-protección y aumento en la calidad de vida; e *in vitro*, citotoxicidad frente a diferentes líneas tumorales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto sinérgico del I-CRP en combinación con la quimioterapia de primera línea en cáncer de mama, ciclofosfamida y epirubicina, en las líneas tumorales Luminal A, MCF-7, y triple negativo, MDA-MB-231. Primero, se evaluó la muerte celular, la morfología de muerte celular, y el daño mitocondrial causado por el I-CRP en ambas líneas. Los resultados muestran que el I-CRP induce muerte y cambios en la morfología celular, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y producción de ROS. El daño celular depende de la producción de ROS en ambas líneas tumorales. Después, se evaluó la inhibición, la muerte y la morfología celular de combinaciones no-constantes y constantes de I-CRP con ciclofosfamida o epirubicina. Los resultados muestran que, en contraste con la ciclofosfamida sola, la combinación con I-CRP incrementa significativamente la inhibición celular en ambas líneas celulares, obteniendo mejores resultados en la muerte celular, con concentraciones constantes a un radio que implique bajas concentraciones de ciclofosfamida y altas de I-CRP. Mientras tanto, la combinación de I-CRP y epirubicina incrementa sinérgicamente la inhibición, en ambas líneas celulares, independientemente de los radios utilizados. Se observó mayor muerte celular al utilizar dosis constantes, o no constantes con radios mayores de I-CRP en MDA-MB-231, y menores en MCF-7. Estos resultados proveen nueva evidencia de los efectos benéficos del I-CRP en combinación con quimioterapia, al incrementar su efecto citotóxico; abriendo una nueva ventana terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama y brindando además un nuevo enfoque potencial contra el agresivo subtipo TNBC.

I. Summary

Breast cancer is the most common malignancy among women worldwide, as well as one of the leading causes of cancer death. Triple negative breast cancer (TNBC), an aggressive molecular subtype, has no effective therapy at present, as cancer cells oftenly become resistant to chemotherapy. It has been proposed that combinational therapy may offer some advantages. Immunepotent *CRP*® (I-CRP), a bovine dializable leukocyte extract, has clinically shown myelo-protection and improvement in quality of patients; and *in vitro* cytotoxicity in different cancer cell lines. The aim of the present study was to evaluate the synergistic effect of I-CRP plus first-line chemotherapeutic agents, cyclophosphamide and epirubicin, against breast cancer cell lines MCF-7 and triple negative MDA-MB-231, *in vitro*. First, we analyzed cell death, cell morphology, and mitochondrial damage induced by I-CRP in both cell lines. Results showed that I-CRP induces cell-death and cell morphology alterations, loss of mitochondrial membrane potential, and ROS production. Cell damage occurs in a ROS-dependent manner in both breast cancer cell lines. Afterwards, we evaluated cell inhibition, cell death, and cell morphology of non-constant and constant ratio combinations with cyclophosphamide or epirubicin, which have been demonstrated to induce ROS production through mitochondrial damage. Results show that, in contrast to cyclophosphamide alone, its combination with I-CRP, increased significantly cell inhibition in both cell lines, with better results in cell death with constant ratios or ratios with low cyclophosphamide concentrations and high I-CRP. In addition, all combinations with epirubicin showed synergistically increased cell inhibition, in all ratios applied. Cell death were significant in constant and non-constant ratios with low I-CRP in MCF-7, and high in MDA-MB-231. Those combinations where cell death-morphology was like I-CRP, cell membrane permeabilization and phosphatidylserine exposure were significantly increased. These results provide new evidence of the benefic effects of the use of I-CRP in combination with chemotherapy, as it increases their cytotoxicity, opening a new therapeutic window for breast cancer treatment and a potential approach to the poorly behaving TNBC subtype.

II. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, siendo el cáncer de mama el mayormente diagnosticado, con más de 1.67 millones de casos nuevos, y 522,000 muertes por año (Bray et al., 2013). En México esta patología ha ido en incremento, representando la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, siendo Nuevo León uno de los estados con la tasa más alta de mortalidad en el país (Rizo-Ríos et al., 2015). A pesar de los avances moleculares, en la actualidad, la quimioterapia continúa siendo el único tratamiento en etapas avanzadas, y en el subtipo molecular TNBC, con resultados desalentadores (Barragán Ruíz et al., 2009). Una de las alternativas empleadas actualmente es el uso de terapias combinacionales, las cuales tienen el objetivo de incrementar el efecto antitumoral disminuyendo las dosis de quimioterapia, y por ende sus efectos tóxicos (Chakraborty et al. 2016; Agrawal et al. 2017; Soo et al. 2015). El Immunepotent CRP®, un bDLE, ha demostrado, *in vivo*, y clínicamente, sus efectos adyuvantes del sistema inmune al inducir mielo-protección (Coronado-Cerda et al., 2016), aumentando, a la par, la calidad de vida de los pacientes (Lara et al. 2010; Franco-Molina et al. 2008); e *in vitro*, citotoxicidad frente a diferentes líneas tumorales (Mendoza-Gamboa et al. 2006; Martínez-Torres et al. 2018). En este trabajo se propone el estudio del I-CRP en combinación con la quimioterapia más frecuentemente utilizada en cáncer de mama: la epirubicina, del grupo de las antraciclinas; y la ciclofosfamida, fármaco alquilante e inmunosupresor, en la línea tumoral MDA-MB-231 y MCF-7, representantes de los subtipos “triple negativo” y Luminal A, respectivamente.

Los resultados muestran que el I-CRP desempeña un excelente efecto antitumoral contra células de cáncer de mama, incluyendo el subtipo TNBC, potenciando sinérgica y aditivamente el efecto citotóxico de la quimioterapia.

Se observó una mayor sensibilidad de la línea “triple-negativo” ante el I-CRP, en comparación con su contraparte triple positivo, de mejor pronóstico; induciendo, en ambas líneas, una citotoxicidad o muerte celular dependiente de ROS, sin descartar la posibilidad de que otras vías estén involucradas también.

La terapia combinatoria con epirubicina *in vitro* demostró que los radios no-constantes con concentraciones bajas de I-CRP y altas de epirubicina, así como también, las combinaciones con concentraciones equipotentes, arrojan los mejores resultados. En estas combinaciones el I-CRP logra sinergizar la epirubicina, ya que logra un incremento significativo en la muerte de las células tumorales, en comparación con el tratamiento por sí sólo, disminuyendo considerablemente la dosis de la quimioterapia en ambas líneas tumorales. En la línea triple negativo se encontró una comparativa mejor respuesta que en MCF-7 en las combinaciones con concentraciones bajas de epirubicina y altas de I-CRP; sugiriendo la posibilidad de reducir al máximo las concentraciones de epirubicina, lo que permitiría a los pacientes con este subtipo de cáncer de mama continuar con su esquema de tratamiento sin interrupciones al evitar los efectos secundarios.

La terapia combinatoria en radios no-constantes con ciclofosfamida, *in vitro*, demostró una diferencia sustancial entre ambas líneas tumorales, encontrando de manera general un efecto aditivo. En la línea “triple negativo” se observó una potenciación de la muerte celular en las combinaciones con concentraciones mínimas de I-CRP y altas de ciclofosfamida; sin embargo, en MCF-7 los mejores resultados se observaron en radios inversos, con concentraciones bajas de ciclofosfamida y altas de I-CRP. Por otro lado, las combinaciones a radios constantes o equipotentes, siempre logran una respuesta positiva, potenciando sinérgicamente la muerte celular, en ambas líneas tumorales, logrando una muerte cercana al 100% con dosis tan bajas como la CC₂₀ (concentración citotóxica 20). Lo anterior abre la puerta al diseño de nuevos esquemas de tratamiento, considerando dosis diferentes a las actualmente empleadas de I-CRP.

Estos resultados proveen nueva evidencia de los efectos benéficos del uso del I-CRP en combinación con la quimioterapia, al tiempo que incrementa su efecto citotóxico reduciendo sus dosis, abriendo una nueva ventana terapéutica en el tratamiento contra el TNBC, un subtipo agresivo de cáncer de mama.

II. ANTECEDENTES

1. Cáncer

1.1 Aspectos Generales

Se le denomina tumor a todo crecimiento anormal dentro del cuerpo, que produce una masa y comprime tejidos anexos. Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores malignos o neoplasmas generan cáncer, una enfermedad sistémica en el cuerpo. En la actual era molecular, los neoplasmas se definen como: un desorden en el crecimiento celular que es desencadenado por una serie de mutaciones adquiridas que afectan a una sola célula y a su progenie clonal, otorgando a la célula neoplásica una ventaja de crecimiento y sobrevivencia, resultando en una proliferación excesiva independiente de las señales de crecimiento fisiológicas (Kumar et al. 2008). Los neoplasmas, pueden surgir de cualquier célula que conforma nuestro cuerpo, por lo tanto, existen reportados más de 100 tipos diferentes, según la Organización Mundial de la Salud (Bray et al., 2013). El crecimiento acelerado de las células cancerosas tiene como característica la invasión de zonas adyacentes a su lugar de origen, y finalmente la diseminación a órganos distantes, concepto que recibe el nombre de metástasis. La metástasis suele afectar prontamente la función esencial del órgano invadido, produciendo un declive rápido en la salud, lo que conlleva a la muerte.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2012 se reportaron 14.1 millones de casos nuevos por esta enfermedad, causando la muerte de más de 8.2 millones de personas; mientras que otras 32.6 millones de personas viven con esta enfermedad. A pesar de los avances en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer, se prevé que el número de casos nuevos por año en los próximos 20 años aumente un 70%, con una incidencia total de 23,800,000 casos aproximadamente (Ferlay et al., 2015).

En mujeres, el cáncer de mama es el cáncer mayormente diagnosticado en el mundo, con más de 1,700,000 casos detectados en 2012. Constituye el segundo tumor mundialmente

más frecuente (25% de todos los cánceres). Según la OMS en los últimos 25 años el número de casos nuevos por año se ha duplicado (Bray et al. 2013). En México, la mortalidad se incrementó en el último decenio (ASMR de 6.6 a 9.8 por 10⁵); por lo que desde el 2012 a la fecha, es considerada como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, sobrepasando al cáncer cervicouterino. Específicamente en Nuevo León, la tasa de mortalidad estandarizada por esta enfermedad es de 14%, ubicándolo junto con Coahuila, Baja California, Baja California Sur, Sonora, Jalisco y Distrito Federal, como uno de los estados con las tasas de mortalidad más altas del país (Rizo et al., 2015).

Para atacar el problema, nuevas estrategias en salubridad, tanto a un nivel de prevención primaria y secundaria (promoción de la salud y protección contra factores de riesgo/ diagnóstico precoz y tratamiento oportuno), así como terciaria (tratamiento en etapas tardías/ rehabilitación física, mental y social), están siendo implementadas actualmente. Para entender y tratar el cáncer es importante conocer los mecanismos celulares implicados en el origen y desarrollo de las células cancerígenas.

1.2 Origen y desarrollo de células cancerígenas

El desarrollo del cáncer en los individuos adultos surge del acúmulo de mutaciones genéticas en células somáticas. El desarrollo de los tumores avanza por un proceso análogo a la evolución darwiniana, en el cual la sucesión de cada cambio genético le confiere a la siguiente una ventaja en el crecimiento celular, que conduce a la transformación progresiva de células normales a células cancerosas. En el proceso de transformación las células sanas adquieren cambios genómicos irreversibles que les confieren características de malignidad, tales características se resumen en 6 “*Hallmarks*” o marcas distintivas, las cuales son: evasión a la apoptosis, autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a supresores del crecimiento, angiogénesis ininterrumpida, potencial replicativo ilimitado, evasión del sistema inmune, y metástasis (Hanahan & Weinberg 2000). La *iniciación* se refiere a los eventos a nivel genómico que incluyen la activación de proto-oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores que le brindan a la célula iniciada las 6 marcas distintivas o “*hallmarks*” de malignidad. Sin

embargo, estas no son suficientes para el desarrollo de cáncer. Además de la iniciación, la transformación progresiva del cáncer requiere de 2 fases más: *promoción* y *progresión*. El desarrollo del tumor es *promovido* por la sobrevivencia de estas células iniciadas y la expansión de su progenie clonal; y la *progresión*, de un crecimiento substancial en el tamaño del tumor y metástasis relacionadas con el crecimiento, sin ser mutuamente excluyentes (Rakoff-Nahoum, 2006).

Investigaciones en las últimas 2 décadas ha solidificado el concepto de que el desarrollo del tumor y la malignidad es el resultado de procesos que involucran tanto a las células cancerosas como a células no cancerosas, muchas de las cuales componen el microambiente tumoral. Evidencia epidemiológica apunta hacia una relación entre inflamación (células y citocinas pro-inflamatorias del sistema inmune) y el desarrollo del cáncer. Muchos mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas y eicosanoides son capaces de estimular la proliferación tanto de células sanas como transformadas, y *promover* el desarrollo de células iniciadas, que han sufrido cambios malignos. Como lo describe Coussens y Hanahan, el crecimiento del tumor puede ser bifásico. En la primera fase el cuerpo trata los tumores como una herida, confiriéndole la inflamación necesaria para la *promoción*, como se describe anteriorente, creando un microambiente tumoral constituido por células tumorales y componentes del sistema inmune. Posteriormente, en la segunda fase, durante el crecimiento tumoral tardío, el tumor dirige ahora a las células del sistema inmune dentro del microambiente tumoral para crear un ambiente inmunosupresor que evada la respuesta inmune del cuerpo contra el tumor, favoreciendo el *desarrollo* de su *progresión* y metástasis (Rakoff-Nahoum, 2006).

Con base en los conocimientos de las alteraciones celulares, se han podido formular tratamientos dirigidos a contrarrestar principalmente tres de sus capacidades: *i) La resistencia a la muerte celular*, por medio de la citotoxicidad directa, por ejemplo empleando terapias basadas en anticuerpos o moléculas pequeñas (Musolino et al. 2018); *ii) La proliferación celular sostenida*, generando arresto en el ciclo celular, por ejemplo empleando agentes anti-proliferativos (paclitaxel) o anti-metabolitos (5-fluoracilo) (Lewis 2007); y *iii) La evasión de la destrucción por el sistema inmune*, aumentando la inmunogenicidad de las células tumorales, utilizando, por ejemplo, inmunoterapia autóloga de células dendríticas con linfocitos T CD8+ (Houot et al., 2015), entre otros.

2. Cáncer de mama

2.1 Anatomía y origen de las lesiones por cáncer de mama

Las glándulas mamarias están conformadas por tejido mamario, tejido conectivo, tejido graso circundante, vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos (**Fig. 1**).

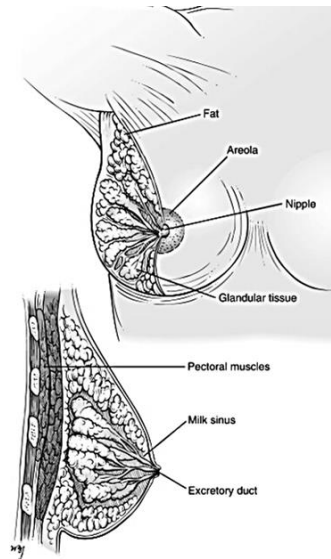


Figura 1. Anatomía de la glándula mamaria y tejido mamario. Arriba, se muestra una disección anterior de piel y tejidos subcutáneos que muestra la prolongación axilar y el cuadrante superoexterno, sitio más frecuente de tumores. Abajo, un corte sagital muestra los componentes del tejido mamario dentro de la glándula. Fuente: Netter. 2003. Atlas de Anatomía humana. Icon Learning Systems: New Jersey, pp. 175-177.

Particularmente, el tejido mamario está conformado por 15-25 lóbulos; y dentro de cada uno de ellos, existen entre 50-75 lobulillos por lóbulo. Cada lobulillo alberga un acino (glándula secretora), cuya secreción es vertida en la porción terminal del sistema de conductos hacia el pezón. De adentro hacia afuera, el sistema de conductos se divide en: *i) porción terminal*, drenando cada lobulillo; *ii) conductos subsegmentales*, agrupando varias porciones terminales dentro de un mismo lóbulo; *iii) conductos segmentales* (aproximadamente 18), que agrupan los conductos subsegmentales de cada lóbulo y llevan el contenido glandular directamente al pezón (**Fig. 2**).

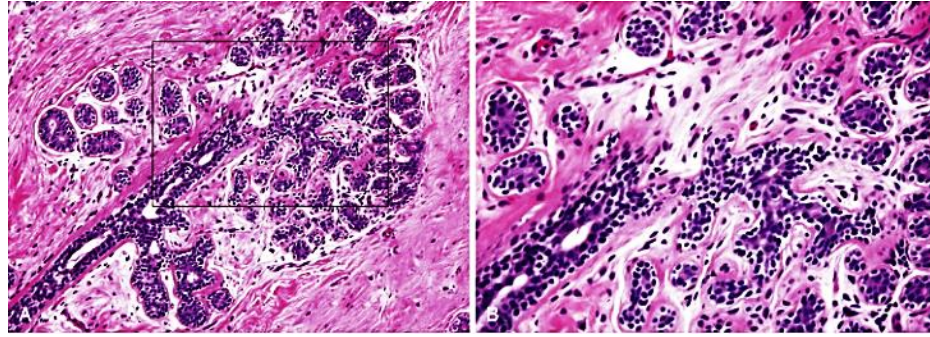


Figura 2. Corte histológico de la unidad acino-tubular terminal del tejido mamario. En A se observa una unidad lóbulo-ducto terminal. El lóbulo está compuesto por múltiples lobulillos. De manera ampliada, figura B, se observa la capa interna epitelial (citoplasma denso) y la capa externa mioepitelial (citoplasma claro) del ducto (Dabbs 2014).

Las células que conforman estas estructuras, células acinares en los lóbulos y células luminales o endoteliales en los ductos (**Fig. 3**), suelen expresar de manera constitutiva receptores de estrógeno (RE) y progesterona (RP), quedando expuestas a los cambios hormonales durante la vida de la mujer, y otorgando a la célula la morfología, tamaño y función característica de las diferentes etapas del desarrollo. Estas células sufren por lo tanto abundantes cambios, los cuales se consideran normales. El tejido mamario, se conforma, por otro lado, de células mioepiteliales, que recubren a las células luminales y dan soporte a las glándulas y ductos, y que no expresan receptores hormonales nucleares, pero sí receptores de crecimiento epidermal, contando con un perfil de expresión genética distinto (Dabbs, 2014) (**Fig. 3**). La exposición inusual a factores fisicoquímicos, hormonales o biológicos, son los que generan en estas células su *iniciación*, *promoción* y *progresión* hacia lo que conocemos como cáncer de mama.

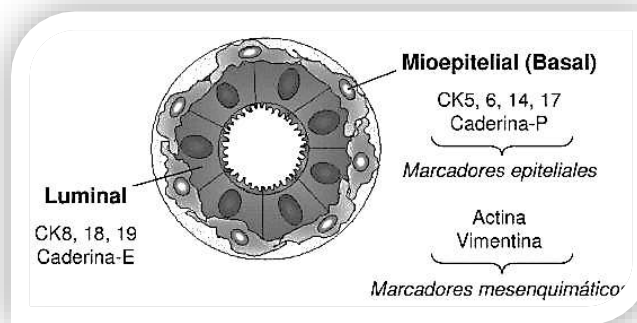


Figura 3. Células que conforman el tejido mamario y sus principales marcadores proteicos. (Dabbs 2014)

El ganglio “centinela”, definido como el primer ganglio linfático a donde las células malignas viajan desde el tumor primario, se encuentra generalmente dentro del grupo axilar regional (**Fig. 4**); su biopsia o SLNB (biopsia de ganglio linfático en inglés), es un procedimiento indispensable para la estadificación del cáncer de mama y posterior selección terapéutica; un resultado positivo en la SLNB indica que el cáncer está presente en los ganglios linfáticos regionales y se ha diseminado, posiblemente, a otros órganos (www.cancer.gov, 2018).

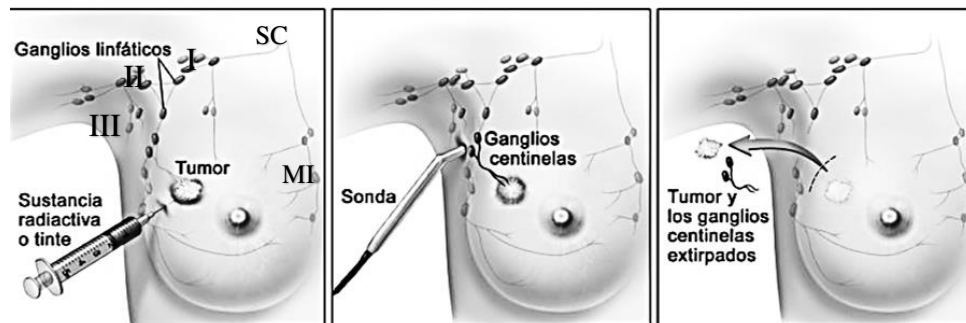


Figura 4. Drenaje linfático de la mama. Una sustancia radioactiva es inyectada en el tumor, el material inyectado se visualiza detectando radioactividad. El o los ganglios centinelas (los primeros en absorber el material) se localizan con un arpón, para posteriormente extirparlos. Se muestra los ganglios linfáticos regionales: ganglios linfáticos axilares en sus regiones I, II y III demarcados por el músculo pectoral menor; ganglios linfáticos supraclaviculares (SC) y ganglios linfáticos mamarios internos (MI). (Fuente: www.cancer.gov, 2018).

2.2 Lesiones malignas del tejido mamario: clasificación convencional y molecular

El cáncer de mama se caracteriza por un conjunto de lesiones celulares malignas altamente heterogéneas y morfológicamente diversas, las cuales, por años, han sido difícil de agrupar. La clasificación patológica convencional, las agrupa de acuerdo con su histología en: lesiones *in situ* y lesiones invasivas. Las lesiones *in situ* (que no traspasan membrana basal), se dividen en: ductales (carcinoma ductal *in situ*) y lobulares (carcinoma lobular *in situ*). Las lesiones invasivas consisten en una variedad mayor de subtipos histológicos; los cuales gracias a un reporte publicado por el National Cancer Institute, se clasifican según su porcentaje de aparición, en: carcinoma ductal infiltrante (76%), carcinoma lobular invasivo (8%), carcinoma ducto-lobular (7%), mucinoso o coloide (2.4%), tubular (1.5), medular (1.2%) y papilar (1%) (Li et al., 2005). Existen otras variantes reportadas en otros estudios: cáncer de mama metaplásico, micro-papilar invasivo, y adenoideo quístico, los cuales representan menos del 5% de las lesiones (Corben, 2013).

La heterogeneidad celular y molecular del cáncer, y el largo número de genes involucrados en el control del crecimiento, diferenciación y muerte celular alterados, enfatiza la importancia de estudiar las alteraciones génicas múltiples en conjunto. Gracias al desarrollo de tecnologías sofisticadas que permiten identificar la expresión simultánea de múltiples genes (microarray), en el año 2000, Perou y cols. iniciaron el estudio de la expresión génica del cáncer de mama y lograron caracterizar esta enfermedad altamente heterogénea, en cuatro subtipos moleculares, los cuales recibieron el nombre de subtipos “intrínsecos”, logrando finalmente la caracterización biológica del cáncer de mama (Perou et al. 2000) (**Tabla 1**).

2.3 Subtipos moleculares de cáncer de mama

Posterior a lo realizado por Perou y cols. en el 2000; en el año 2002 Van't Veer y cols., realizaron un estudio de la predicción de este perfil genético y sus resultados en clínica, descubriendo que este método brindaba además un adecuado pronóstico de la respuesta

de las células tumorales frente a la quimioterapia (**Fig. 5**). Modificado posteriormente por Sorlie en el 2003, esta clasificación se utilizó para agrupar los subtipos moleculares conforme su respuesta al tratamiento en: i) *neoplasias de bajo grado o “luminales”* (por su semejanza en la expresión génica con las células endoteliales del lumen ductal), aquellas que expresan RE y RP; y en ii) *neoplasias de alto grado o “basales”*, semejantes a las mioepiteliales, aquellas que no expresan RE ni RP, pero en las cuales hay sobre-expresión o amplificación de Her2.

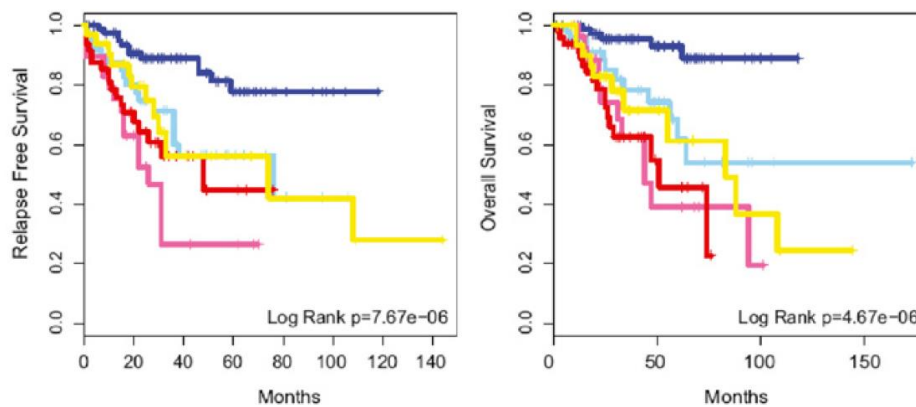


Fig. 5. Curvas de Kaplan–Meier para la sobrevivencia libre de enfermedad y para la sobrevivencia total, basado en el estudio UNC337. Azul, luminal A; Celeste, luminal B; Rojo, basal-like; Rosa, HER2-enriquecido; Amarilla, Triple Negativo: Claudin-low. (Adaptado: Eroles y Bosch, 2011)

Así, los tumores luminales fueron divididos en 3 grupos: Luminal A (RE y RP positivos, HER2/neu negativo, y bajo índice de proliferación), Luminal B (RE o RP positivos, HER2/neu negativo e índice de proliferación alto), y Luminal HER2/neu positivo. Se determinó que un punto de corte del Ki-67 de 14% o más podía discriminar entre los subtipos Luminal A y B (**Tabla 1 y 2**). Parker y cols. en el 2009, compararon el subtipo luminal A, con el B y el Her2/neu positivo, y observaron en estos últimos dos una mala sobrevida libre de enfermedad y menor sobrevida total con o sin tratamiento endócrino y/o quimioterapia (**Fig. 5**). Se reportó que, aunque el subtipo luminal A presentaba la menor sensibilidad a la quimioterapia neoadyuvante (respuesta completa patológica, pCR, <7%), otros tratamientos como la endocrino-terapia dirigidos contra los RE o RP,

presentaban buena respuesta, volviendola la de mejor pronóstico, con un número menor de recaídas. El subtipo luminal B a pesar de tener un comparativo peor pronóstico que el A, responde mejor al tratamiento con quimioterapia, obteniendo un pCR >17% (Parker et al., 2009).

Tabla 1. Subtipos moleculares de cáncer de mama.

Subtipo	Inmunofenotipo	Comportamiento
Luminal A	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (-)	<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo más común y menos agresivo. Buen pronóstico. • Bajo grado histológico. Respuesta hormonal. • Asociado a incremento de edad.
Luminal B	RE (+) y/o RP (+); HER2/neu (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Similar al Subtipo Luminal A. Peor resultado que el Subtipo Luminal A. • Más frecuentemente RE (+)/RP (-).
Basal	RE (-); RP (-); HER2/neu (-) CK 5/6 (+) y/o EGFR (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Subtipo agresivo. • Alto grado histológico e índice mitótico. • Riesgo en edades menores (<40 años). • Más frecuente en mujeres premenopáusicas afroamericanas.
HER2/neu (+); RE (-)	RE (-); RP (-); HER2/neu (+)	<ul style="list-style-type: none"> • Menos común. Subtipo altamente agresivo. • Alto grado histológico. • Riesgo en mujeres <40 años, mayor que el subtipo luminal. • La etnia afroamericana puede ser un factor de riesgo. • Resultado mejorado por HER2/neu (+).

(Adaptado: Eroles y Bosch, 2011)

Los tumores receptores de estrógenos negativos se dividen en: subtipo basal y subtipo de sobreexpresión de Her2/neu (**Tabla 1 y 2**). El subtipo basal es conocido como triple-negativo por la falta de expresión de RE, RP y Her2/neu; representa el subtipo más agresivo, cuya sobrevida total y libre de enfermedad es baja, cada vez que las células tumorales se vuelven quimioresistentes y no cuentan con blancos terapéuticos. De acuerdo con lo descrito por *Parker y col* en 2009, las células tumorales triple negativo son las que mayor sensibilidad presentan frente a la quimioterapia neoadyuvante con una pCR de 43%, por lo que éste se vuelve el principal y único tratamiento. Lefort y cols. en 2014, encontraron que dentro del subtipo basal-like, existían dos grandes grupos, que diferían en su expresión del gen MAP1LC3B (gen relacionado a autofagosoma), y que marcaba el pronóstico de sobrevida total y sobrevida libre de enfermedad de los pacientes. En su

estudio demuestra la correlación del número basal de autofagosomas (basado en la cantidad citoplasmática de LC3B), con la cantidad de proliferación e invasividad dada por el co-activador transcripcional YAP1 (Yes-associated protein 1). Concluyendo que la autofagia se correlaciona con la proliferación e invasividad exclusivamente en este subtipo molecular, dando su mal pronóstico.

El subtipo de sobreexpresión de Her2/neu se asocia a la sobreexpresión de genes ubicados en el cromosoma 17q como el ERBB2 y el GRB7 (**Tabla 2**); cuando estos están amplificados se asocian a un mal pronóstico, además de una mala respuesta a la quimio y endocrino-terapia (pCR 36%). Este subtipo corresponde a la mitad del cáncer de mama que son Her2-enriquecidos. En estos pacientes el tratamiento con transtuzumab suele ser la única opción y tener buenos resultados. Cabe mencionar que no se puede generalizar el pronóstico otorgado por los subtipos intrínsecos hacia mujeres afroamericanas premenopáusicas, en cuyo caso los resultados finales del tratamiento en la sobrevida total suelen ser peores (O'Brien et al., 2010).

Tabla 2. Características de los subtipos moleculares del cáncer de mama.

Molecular Subtype	Frequency	ER/PRg/HER2	CK5/6 EGFR	Genes of Proliferation	Characteristics genes	Histologic grade	TP53 mutations	Prognostic
Basal-like	10-20%	ER- PRg- HER2-	+	High	KRT5, CDH3, ID4, FABP7, KRT17, TRIM29, LAMC2	High	High	Bad
HER2-enriched	10-16%	ER- PRg- HER2+	+/-	High	ERBB2, GRB7	High	High	Bad
Normal breast-like	5-10%	ER-/+ HER2-	+	Low	PTN, CD36, FABP4, AQP7, ITGA7	Low	Low	Intermediate
Luminal A	50-60%	ER+ PRg+ HER2-	-	Low	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, CCND1, LIV1	Low	Low	Excelent
Luminal B	10-20%	ER+/- PRg+/- HER2+/-	-	High	ESR1, GATA3, KRT8, KRT18, XBP1, FOXA1, TFF3, SQLE, LAPTM4B	Intermediate /High	Intermediate	Intermediate /Bad
Claudin-low	12-14%	ER- PRg- HER2-	+/-	High	CD44, SNAI3	High	High	Bad

(Adaptado: Eroles y Bosch, 2011)

En 2010, Subik y cols., partiendo de lo propuesto por Perou y cols. en 2000, caracterizaron la expresión genética de las líneas celulares de cáncer de mama existentes, catalogándolas en subtipos intrínsecos. Múltiples investigaciones correlacionan los resultados experimentales encontrados en líneas celulares con las muestras tumorales de pacientes catalogadas con el mismo subtipo molecular, ofreciendo materia prima fidedigna para la investigación traslacional de nuevos tratamientos en etapas preclínicas.

La línea celular MCF-7, proveniente de un carcinoma ductal invasivo, se obtuvo de la efusión pleural (sitio metastásico) de una mujer caucásica de 69 años, y se ha mantenido como una línea tumoral inmortal. Molecularmente representa el subtipo Luminal-A, RE y RP positivo (Subik et al., 2010). Su estudio genómico revela mutaciones en los genes CDKN2A y PIK3CA (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines/>). La morfología de las colonias formadas por MCF-7 en forma de masas, se correlaciona con su perfil de expresión genética no invasivo, medido mediante el índice de proliferación (3D) (Kenny et al., 2007) (**Fig. 6 A**). Basalmente, MCF-7 expresa un índice bajo de LC3B o autofagosomas, y su expresión no se correlaciona con un incremento en la capacidad proliferativa o invasiva (Lefort et al., 2014). La línea celular MDA-MB-231, de origen epitelial, fue obtenida de un sitio metastásico (efusión pleural) de una mujer de 51 años con diagnóstico de adenocarcinoma. Representa el subtipo molecular basal like B ó “triple negativo”, debido a la ausencia de receptores hormonales y de HER2neu, clasificada como el subtipo de peor pronóstico (Subik et al., 2010). Presenta distintas mutaciones, entre las que se encuentran las de BRAF y CDKN2A. Se caracteriza por la expresión de genes similares a las de las células mioepiteliales normales, entre los que se encuentran CK5, CK17, P-cadherin, caveolin 1 y 2, nestina, CD44, EGFR, β -catenina y β 1-integrina (Kenny et al., 2007; Eroles et al., 2012a). La morfología de las colonias en forma estrellada, correlaciona con su perfil de expresión genética y mal pronóstico, caracterizado por núcleos desorganizados y cuerpo celular elongado con procesos invasivos. Lefort y col. en 2014 encontraron una expresión incrementada de MAP1LC3B a nivel de mRNA y proteína en distintos cohortes de estudios en pacientes con cáncer de mama subtipo basal-like y en la línea tumoral MDA-MB-231, y lo correlacionaron con la cantidad de autofagosomas por célula epitelial. La expresión incrementada del gen MAP1LC3B, fue asociado a un mal pronóstico, únicamente en el subtipo TNBC, ya que confiere propiedades proliferativas e invasivas en estas células (Lefort et al., 2014) (**Fig. 6 C,D**).

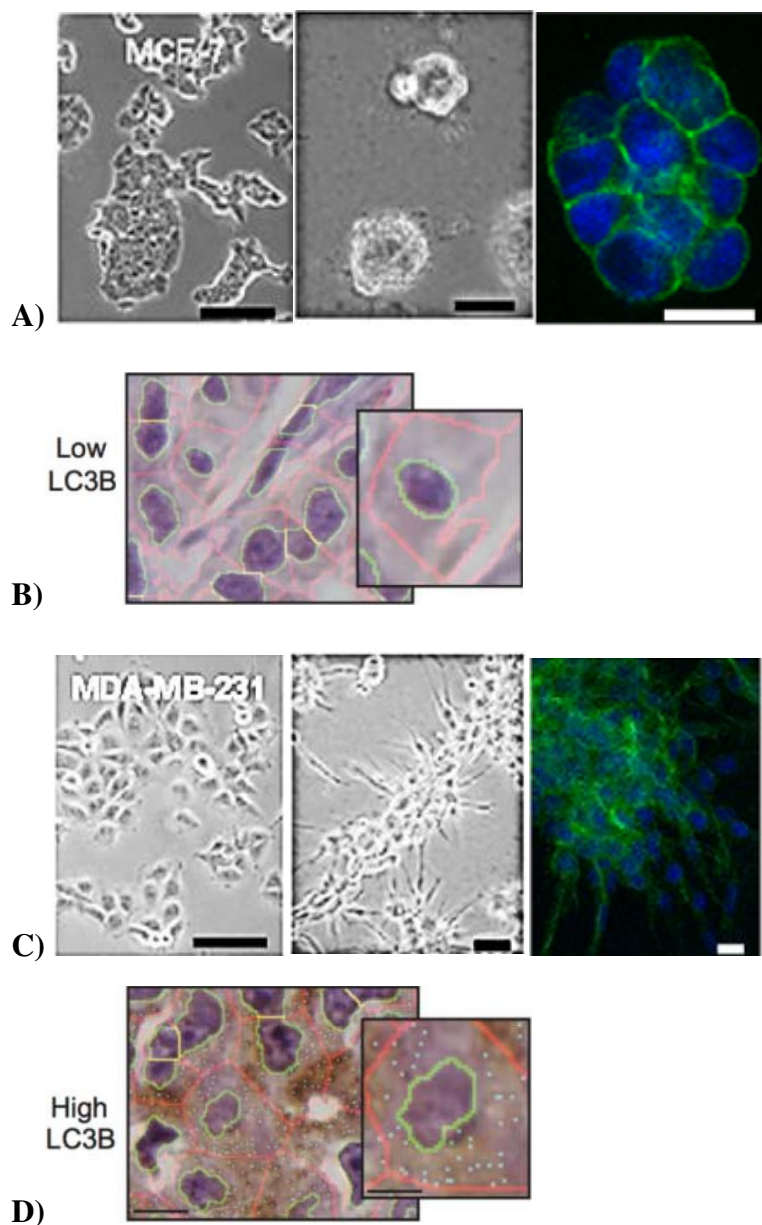


Figura 6. Morfología en 2^{da}- y 3^{era}-dimensión e inmunotinción de LC3B en líneas celulares de cáncer de mama. A) MCF-7 y C) MDA-MB-231 cultivadas en frasco de cultivo de poliestireno de 75cm², y vistas a microscopía de luz en el panel a la izquierda. En el panel de en medio y a la derecha, cultivadas en 3D IrECM, donde se muestra agrupadas en su forma tridimensional y vistas a microscopía de luz y en imagen con fase de contraste con F-actina/DAPI, respectivamente. Secciones ópticas de las colonias representativas son mostradas. Escala de barras: panel a la izquierda 100mm, panel de en medio 50mm, y panel a la derecha 20mm (Kenny et al., 2007). Análisis computacional IHC con segmentación automática y algoritmo de cuantificación de las imágenes de inmunotinción de LC3B en B) MCF-7 “Luminal A” y D) MDA-MB-231 “TNBC”. Membrana nuclear y plásmática en verde y rojo respectivamente. Escala de barras: D 20mm (baja magnificación) y 10 mm (alta magnificación en secciones insertadas) (Lefort et al., 2014).

2.4 Diagnóstico

El estudio del grado histológico y la estadificación del tumor son los métodos utilizados para llevar a cabo el diagnóstico y la elección de tratamiento del cáncer, de manera convencional.

Las pacientes con una tumoración o anormalidad son sometidas a la toma de biopsia por aspiración con aguja fina o gruesa “tru-cut” por medio de imagen, para la confirmación del diagnóstico histopatológico. En el estudio se deberá realizar, entre otras cosas, ensayos de inmunohistoquímica por FISH o CISH, para detectar la expresión de RE y RP, así como de Her2/neu (Salud 2009). Recibiendo de esta manera, el nombre (por ejemplo: carcinoma ductal *in situ*), el nivel de diferenciación (bajo o alto grado), y la presencia de receptores hormonales o de crecimiento (RE -/+, RP -/+ y Her2 -/+). Finalmente, para recibir un tratamiento, las pacientes son estadificadas de acuerdo con la clasificación TNM, la cual se describe a continuación.

2.5 Estadificación

La estadificación es un sistema de clasificación de tumores sólidos. El mayor sistema de estadificación actual es el TNM (*T* por tumor primario, *N* por nódulo o ganglio linfático involucrado, y *M* por metástasis, por sus siglas en inglés), otorgado por la AJCC o *American Joint Committee on Cancer Staging* (Mitchell, 2015). La estadificación TNM varía según el tipo de cáncer, en cáncer de mama:

- *T*, refleja el incremento del tamaño del tumor primario. *T_x*, indica que el tumor primario no se puede evaluar; *T₀*, que no existe tumor primario; *T_{is}*, (DCIS/ LCIS/ Paget) indica una lesión *in situ* ductal, lobular y tipo paget respectivamente; *T₁*, un tumor de diámetro ≤ 2 cm; *T₂*, tumor ≥ 2 cm, pero ≤ 5 cm; *T₃*, tumor mayor de 5 cm; *T₄* tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared del tórax o la piel.
- *N*, representa el número de ganglios linfáticos regionales invadidos por células tumorales. *N_x*, los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar; *N₀*, ningún

ganglio involucrado; N₁, metástasis a ganglios axilares fijos ipsilaterales; N₂, metástasis a ganglios axilares fijos o mamaros internos clínicamente aparentes; N₃, metástasis a ganglios linfáticos supraclaviculares o de la cadena mamaria interna clínicamente aparentes.

- M, describe la afectación de otros órganos diferentes al del tumor primario (tejido mamario). M_x, las metástasis a distancia no se pueden evaluar; M₀, no hay metástasis a distancia; M₁, existen metástasis a distancia.

Conociendo la terminología empleada por la AJCC, las lesiones por cáncer de mama pueden ser estadificadas en 5 grupos, que van del 0 al IV (**Tabla 3**).

Tabla 3- Estadios del Cáncer de mama.

Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio I	T1*	N0	M0
Estadio IIA	T0 T1* T2	N1 N1 N0	M0 M0 M0
Estadio IIB	T2 T3	N1 N0	M0 M0
Estadio IIIA	T0 T1* T2 T3	N2 N2 N2 N1, N2	M0 M0 M0 M0
Estadio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Nota: *T1 incluye T1 mic

Tis tumor *in situ*; T1 tumor ≤2.0cm; T2 tumor ≤2.0cm/ ≥5cm; T3 tumor >5cm; T4 cualquier tamaño con extensión directa a tejidos adyacentes. N0 ningún ganglio linfático involucrado; N1 ganglios axilares fijos ipsilaterales; N2 ganglios axilares fijos o mamaros internos palpables; N3 ganglios linfáticos supraclaviculares palpables. M0 sin metástasis; M1 metástasis a distancia (AJCC, 2016).

2.6 Pronóstico

Partiendo del método de diagnóstico convencional, se dice que, el estadio I presenta un índice de sobrevivencia relativa a 5 años de 98%. El estadio II presenta un índice de sobrevivencia a 5 años del 76-88%. El estadio IIIA tiene índice de supervivencia relativa a 5 años del 56% y el IIIB de 46%. El estadio IV se caracteriza por un índice de sobrevivencia relativa a 5 años menor al 16% (Salud 2009).

En EUA y algunos países de Europa, el pronóstico otorgado a través de esta clasificación está siendo gradualmente sustituido, por las pruebas predictivas moleculares aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration), esto con el principal propósito de aprovechar los avances moleculares y predecir la respuesta al tratamiento, con índice pronóstico más certero. Con ello contribuyen a la mejor elección terapéutica. Algunos de ellos son:

- *Puntaje de recurrencia (RS, por sus siglas en inglés) u Oncotype DX*

Es el ensayo pronóstico mejor validado por la ASCO (American Society of Clinical Oncology), consiste en un puntaje de 21 genes que ayuda a predecir si tanto el estado I como el II del cáncer de mama, receptor-estrógeno positivo, con ganglio negativo, recurrirá localmente o se diseminará a otras partes del cuerpo a pesar de la terapia con tamoxifeno (Harris et al., 2007). El riesgo puede ser bajo (<18), medio (18-30) o alto (>30). Si el riesgo es alto, predice una mayor tasa de sobrevivencia libre de enfermedad a 10 años con el uso de quimioterapia adicional al tamoxifeno (con CMF: Ciclofosfamida, Metotrexato y Fluoracilo); en comparación con tamoxifeno sólo (88 contra 60% respectivamente; [RR] 0.26, 95% IC 0.13-0.53), en pacientes tanto con ganglios negativos como con positivos (Paik et al., 2006). Se observaron los mismos resultados, en otro estudio, en pacientes postmenopáusicas (Albain et al., 2010). En ambos el riesgo medio y bajo, no muestra cambios significativos.

- *Perfil 70-genes Amsterdam o Mamma print*

Fue uno de los primeros arreglos de expresión genética diseñados con propósitos pronósticos. Esta puede ser usada como pronóstico en pacientes con cáncer de mama independientemente de la expresión de receptores hormonales, así como también en

pacientes con Her2/neu positivo. A diferencia del RS esta prueba no provee información predictiva de la respuesta al tratamiento adyuvante. Consiste en un puntaje matemático obtenido en “*Adjuvant! Online and the 70-gene signature*” que distribuye a las pacientes en: pobre o buen pronóstico. Útil para pacientes con un estadio I o II de cáncer de mama con ganglios linfáticos negativos. Actualmente un largo estudio internacional denominado “*Microarray in Node-Negative Disease May Avoid Chemotherapy (MINDACT) trial*”, se realiza para determinar su valor predictivo frente al tratamiento adyuvante.

- *Análisis de Microarreglo Predictor 50 o PAM50 (por sus siglas en inglés)*

Es utilizado en la Unión Europea para pronosticar pacientes menores de 60 años con cáncer de mama, con receptor-estrógeno positivo y ganglios negativos. PAM50 caracteriza a las pacientes según su subtipo intrínseco (luminal A o B) y los resultados junto con el tamaño del tumor, son usados para generar una *Puntuación de Riesgo de Recurrencias* (ROR, por sus siglas en inglés) que las estratifica en subgrupos de bajo, medio y alto riesgo. En conjunto PAM50 y ROR añaden información pronóstica más allá de lo que podría ser evaluada por factores clínicos. Estudios han demostrado su mayor efectividad en comparación con el método RS en la identificación de pacientes de alto riesgo (Dowsett et al., 2013).

A pesar de los avances moleculares en el pronóstico de la respuesta al tratamiento, las pruebas convencionales de diagnóstico (antes mencionadas), continúan siendo indispensables en el diagnóstico y tratamiento de las pacientes con cáncer de mama en nuestro país.

2.7 Tratamiento

El tratamiento de cáncer de mama está conformado por una combinación de opciones que van desde cirugía, radioterapia, quimioterapia, tratamiento hormonal y biológicos. La elección del tratamiento varía según el estadio, como se describe a continuación:

Estadio 0 (Carcinoma ductal in situ: ductal y lobular)

Carcinoma ductal *in situ*: *i*) escisión completa del tumor + radioterapia, *ii*) o mastectomía simple con o sin reconstrucción, *iii*) o escisión completa del tumor + observación clínica. La decisión por alguno de estos tratamientos se toma de acuerdo con los criterios de recurrencia de Van Nuys (American Journal of Surgery 2003). En pacientes con mastectomía simple está indicado el mapeo y biopsia de ganglio centinela. Si presenta receptor-estrógeno positivo y es premenopáusica se añade tamoxifeno por 5 años; y si es postmenopáusica se otorga inhibidores de aromatasa por 5 años.

Estadio I y II

Cirugía conservadora o Mastectomía radical, se decidirá la mejor opción que permita un margen quirúrgico negativo mayor de 2 mm, de preferencia de 10 mm, para disminución del riesgo de recurrencia local. El manejo quirúrgico de la axila es obligatorio en todos los casos de carcinoma mamario invasor, ya que es el factor pronóstico más significativo; se extirpan las regiones I y II, y se puede extender hasta el nivel III si existe enfermedad macroscópica en el nivel II. Si se observa ganglios regionales positivos, se procederá al uso de quimioterapia sistémica. La radioterapia adyuvante está reservada sólo a las pacientes que recibieron cirugía conservadora o a las que recibieron cirugía radical y presentaban un tumor mayor a 5cm y/o de 3 a 4 ganglios positivos, ya que reduce de un 20 a un 25% el riesgo de recurrencias en ellas (NCCN, 2015).

Se considera el inicio de trastuzumab (**Tabla 6**), en conjunto con quimioterapia adyuvante en pacientes con Her2/neu (+), con ganglio o sin ganglio positivo. Quimioterapia a pacientes con subtipo triple negativo, a pesar de ganglio negativo y el inicio de quimioterapia en conjunto con terapia hormonal adyuvante para pacientes con subtipo luminal que caigan en la clasificación de alto riesgo por pruebas moleculares (ver Pronóstico).

Estadio III

- Enfermedad resecable T3N1M0: *i*) mastectomía seguida de quimioterapia adyuvante y luego radioterapia, o *ii*) quimioterapia neoadyuvante para disminuir el tamaño del tumor para efectuar un tratamiento quirúrgico conservador seguido de radioterapia.
- Estadio IIIA, IIIB (excepto T3N1M0), y IIIC: constituye una enfermedad irresecable de inicio, el primer tratamiento debe ser quimioterapia neoadyuvante (**Tabla 3 y Tabla 4**), seguido de una mastectomía radical si hay respuesta. Si no hay respuesta a la quimioterapia neoadyuvante se debe considerar un tratamiento sistémico adicional de segunda elección y/o radioterapia preoperatoria con valoración posterior de cirugía y en caso de continuar sin respuesta se debe de individualizar el tratamiento.

Aquellos con respuesta a la quimioterapia se procederán a tratamiento loco-regional con una mastectomía radical y radioterapia, y luego se completará el tratamiento sistémico de manera individualizada con quimioterapia adyuvante.

Estadio IV y Enfermedad Recurrente

El tratamiento en estadio IV es individualizado y deberá ser dictado por el médico oncólogo. La recurrencia loco-regional sí ocurre dentro de los primeros 2 años, la posibilidad de que exista metástasis es de un 25-30% (Fehm et al. 2004), por lo tanto, la quimioterapia sistémica es generalmente administrada. Cuando las metástasis lo hacen a un solo órgano (50-70%), el tratamiento es individualizado, generalmente involucra quimioterapia sistémica y/o tratamiento paliativo.

Como observábamos, la quimioterapia es siempre una opción terapéutica en la mayoría de los estadios (con excepción del estadio 0), ya que se ha demostrado, a través de los años, en diversos metaanálisis y estudios aleatorizados, que ésta, tanto en su modalidad pre-quirúrgica (neoadyuvante) como postquirúrgica (adyuvante), disminuye la muerte y la recurrencia, aumentando la sobrevida total y la sobrevida libre de enfermedad (Miller et al., 2016).

3. Tratamiento adyuvante contra cáncer

En México, el IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social), el ISSSTE (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores), y el Seguro Popular brindan a sus derechohabientes el tratamiento contra el cáncer siguiendo guías clínicas fundamentadas en otras de talla internacional, como lo son: la Clinical Practice Guidelines in Oncology de la NCCN (National Comprehensive Cancer Network), la AACR (American Association of Cancer Research), entre otras. La quimioterapia, como monodroga, con su dosis y frecuencia, utilizadas en cáncer de mama, se muestran en la Tabla 4.

Si el estado de salud del paciente lo permite, la quimioterapia se administra preferentemente en combinación, con el objetivo de lograr una mayor pCR. Los esquemas múltiples utilizados en cáncer de mama se resumen en la Tabla 5. La NCCN, en sus guías clínicas 2016, recomienda de manera preferente la combinación de CEF (5-fluorouracilo/Epirubicina/Ciclofosfamida), brindando también otras opciones en caso de que el uso de alguno de sus componentes esté contraindicado. Sin embargo, el uso de la monoterapia es ampliamente utilizado.

Tabla 4.- Quimioterapia utilizada contra el cáncer de mama en México.

Monodroga
<p>Antraciclinas: Epirubicina (E) 60-90 mg/m² 1 día Intravenosa (IV) ciclos cada 21 días Doxorubicina liposomal pegilada 40-50 mg/m² 1 día IV, ciclos cada 28 días</p> <p>Taxanes: Paclitaxel 175 mg/m² 1 día IV ciclos cada 21 días Doxetacel 60 – 100 mg/m² 1 día, ciclos cada 21 días</p> <p>Antimetabolitos: Capecitabine 1000-1250 mg/m² Vía oral (VO) 2 veces al día, 1-14 días, ciclos cada 21 días Gemcitabine 800-1200 mg/m² IV día 1, 8 y 15, ciclos cada 28 días</p> <p>Otros inhibidores: Vinorelbine 60 mg/m² VO día 1, 8 y 15 ó 80 mg/m² día 1 y 8 semanal</p> <p>Otros fármacos: Ciclofosfamida (C) 500-600 mg/m² IV ciclos cada 21 días Mitoxantrona (M) 12mg/m² IV ciclos cada 28 días Cisplatino 75mg/m² IV ciclos cada 21 días Fluorouracilo (F) 500mg/m² IV, días 1, 8 ó en infusión de 24 hrs por 5 días, ciclos de 21 días Ixabepilone 40mg/m² IV, ciclos de 21 días</p>

Presentación en monoterapia (Salud 2009).

Tabla 5.- Esquemas de tratamiento múltiple brindados en cáncer de mama.

Poliquimioterapia
<p>FEC (5 fluorouracilo/epirubicina/ciclofosfamida) EC (epirubicina/ciclofosfamida) CMF (ciclofosfamida/metotrexate/5 fluorouracilo) Docetaxel/Capecitabine GT (gemcitabine/paclitaxel) Otras combinaciones: Ixabepilone/capecitabine (categoría 2B)</p>

(Salud 2009).

Se ha demostrado que la adición de un taxano posterior a la culminación de un esquema basado en antraciclinas (**Tabla 6**), mejora considerablemente la sobrevida (C. Group 1998; Lewis 2007).

Tabla 6.- Tratamiento adicional para pacientes con fenotipo Her2 (+).

Medicamentos de elección para Her 2 Neu.
Trastuzumab con: Paclitaxel +/- Carboplatino Docetaxel. Vinorelbine Capecitabine
Dosis del trastuzumab 4 mg/kg IV día 1 Seguido de 2 mg/kg IV semanal o Trastuzumab 8 mg/kg IV día 1 Seguido de 6 mg/kg IV cada 21 días

3.1 Epirubicina

Proveniente del hongo *Streptococcu peucetius* variedad *caesius*, la epirubicina forma parte del grupo de los antibióticos de la antraciclina con efectos citotóxicos antitumorales. Éstos tienen una estructura anular tetracíclica unida a una azúcar poco común, la daunosamina, la cual se encuentra unida a anillos adyacentes de quinona e hidroquinona, que permiten la ganancia y pérdida de electrones. Estos compuestos pueden intercalarse con el DNA y afectar directamente la transcripción y replicación. Forman complejos tripartita con topoisomerasa II y DNA, lo que impide la reunión de las cadenas de DNA y conduce a la acumulación de mutaciones lo que conlleva a una apoptosis intrínseca; los mediadores de este proceso incluyen el sensor p53 de daño a DNA y caspasas activadas, aunque se han relacionado también la ceramida, un producto del catabolismo de lípidos, y el sistema ligando de receptor Fas. Los defectos de la reparación de rupturas de la doble cadena de DNA sensibilizan a las células a daños, en tanto que la expresión excesiva de la reparación del DNA ligada a transcripción puede contribuir a resistencia (Chabner et al., 2006).

Debido a sus grupos quinolona, las antraciclinas también pueden liberar radicales libres (especies reactivas de oxígeno: peróxido de hidrógeno e hidroxilo) que atacan DNA tanto en solución y en tejidos normales, como tumorales (**Fig. 7**) (Štěřba et al., 2013). Las antraciclinas se expulsan de las células tumorales por miembros de la familia de transportadores MRP, una proteína de resistencia en cáncer. Otros cambios bioquímicos en células resistentes incluyen incremento de la actividad de peroxidasa de glutatión, disminución de la actividad o mutación de la topoisomerasa II y aumento de la capacidad de reparar roturas de la cadena de DNA (Chabner et al., 2006).

Los esquemas de dosificación comunes para epirubicina son de 75-100mg/m² I.V. cada 3 semanas ó 20-30mg/m² I.V. semanalmente, con una pCR de 35 a 50%. Los pacientes que recaen hasta 12 meses después del tratamiento con antraciclinas pueden reiniciar de nuevo con dosis acumulativas de epirubicina (800-1000mg/m² I.V.) y obtener el mismo efecto. Los pacientes que recaen previo a los 12 meses de tratamiento con antraciclinas y de nuevo implementan epirubicina, tienen una tasa de respuesta significativamente menor (Andreetta et al., 2010).

Las dosis mayores de 200mg/m² incrementan el riesgo de desarrollar complicaciones cardíacas por acumulación de hierro intracelular (la cual es independiente de la concentración de Fe⁺ sérica), consecuencia de la peroxidación de cardiolipina y liberación de citocromo C de la membrana mitocondrial interna. Otra posible contribución a la cardiotoxicidad incluye una disminución en la expresión del mRNA del receptor Ca²⁺-ATPasa del retrículo sarcoplásmico, que resulta en una disminución de la contractibilidad cardíaca, reportando complicaciones serias, como: arritmias, necrosis del miocardio causando una cardiomiopatía dilatada, y vasooclusión o vasoespasmo causando angina o infarto al miocardio (**Fig. 8**). La exposición prolongada a epirubicina induce también un daño en el mtDNA resultado de la disminución de la actividad de peroxidasa de glutatión cardíaca (GSHPx), y defectos en la cadena de electrones. Los defectos en la cadena de electrones, por otro lado, están asociados a la generación de ROS, los cuales continúan formándose incluso después de terminado el tratamiento, contribuyendo eventualmente a la cardiomiopatía tardía progresiva, que culmina en falla cardíaca (10 a 20 años con dosis

cumulativas $>300\text{mg/m}^2$). La expresión de radicales libres, conlleva a la liberación de citocromo C de la mitocondria, llevando finalmente a la apoptosis (**Fig. 8**).

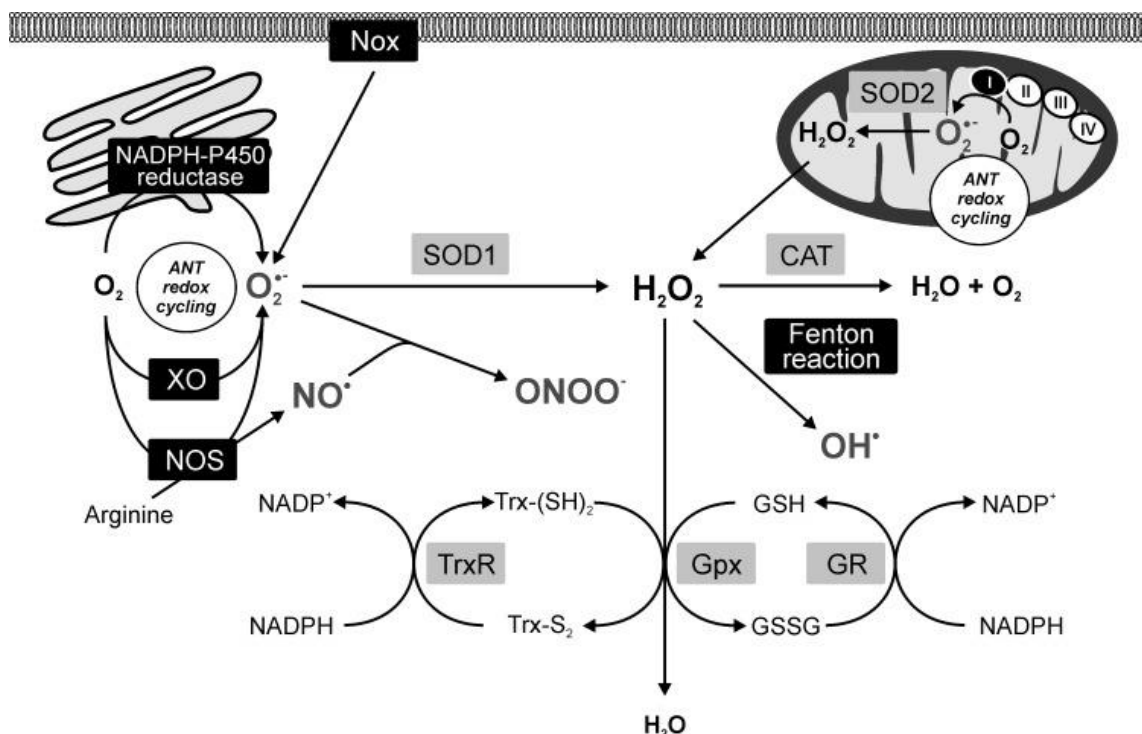


Figura 7. Producción de especies reactivas de oxígeno / nitrógeno inducidas por antraciclinas dentro del contexto celular. Paneles negros-sitios de ciclos redox de antraciclina; paneles grises-defensa antioxidante. I, II, III y IV, complejos de la cadena respiratoria; ANT, antraciclinas; CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; NAD (P), dinucleótido de nicotinamida adenina (fosfato); NO •, NO radical; NOS, NO sintasa; Nox, NADPH oxidasa; • O₂•-, radical superóxido; • OH, radical hidroxilo; ONOO•-, peroxinitrito; SOD1, superóxido dismutasa citosólica (CuZnSOD); SOD2, superóxido dismutasa mitocondrial (MnSOD); TrxR, tioredoxinreductasa; Trx-S₂, tioredoxina oxidada; Trx- (SH) 2, tioredoxina reducida; XO, xantina oxidasa. (Adaptado: Štěrba et al., 2013).

En conjunto con la inmunosupresión severa, la cardiotoxicidad causada por la epirubicina constituyen un factor limitante de la dosis. Se han adoptado una variedad de enfoques para disminuir el riesgo de cardiotoxicidad mientras se mantiene la eficacia. Estos incluyen horarios alternados de administración del fármaco, modificaciones de la molécula de antraciclina y tratamiento adyuvante con bloqueadores beta-adrenérgicos o dexrazoxano (un quelante de hierro de tipo EDTA), con resultados significativos, con este último.

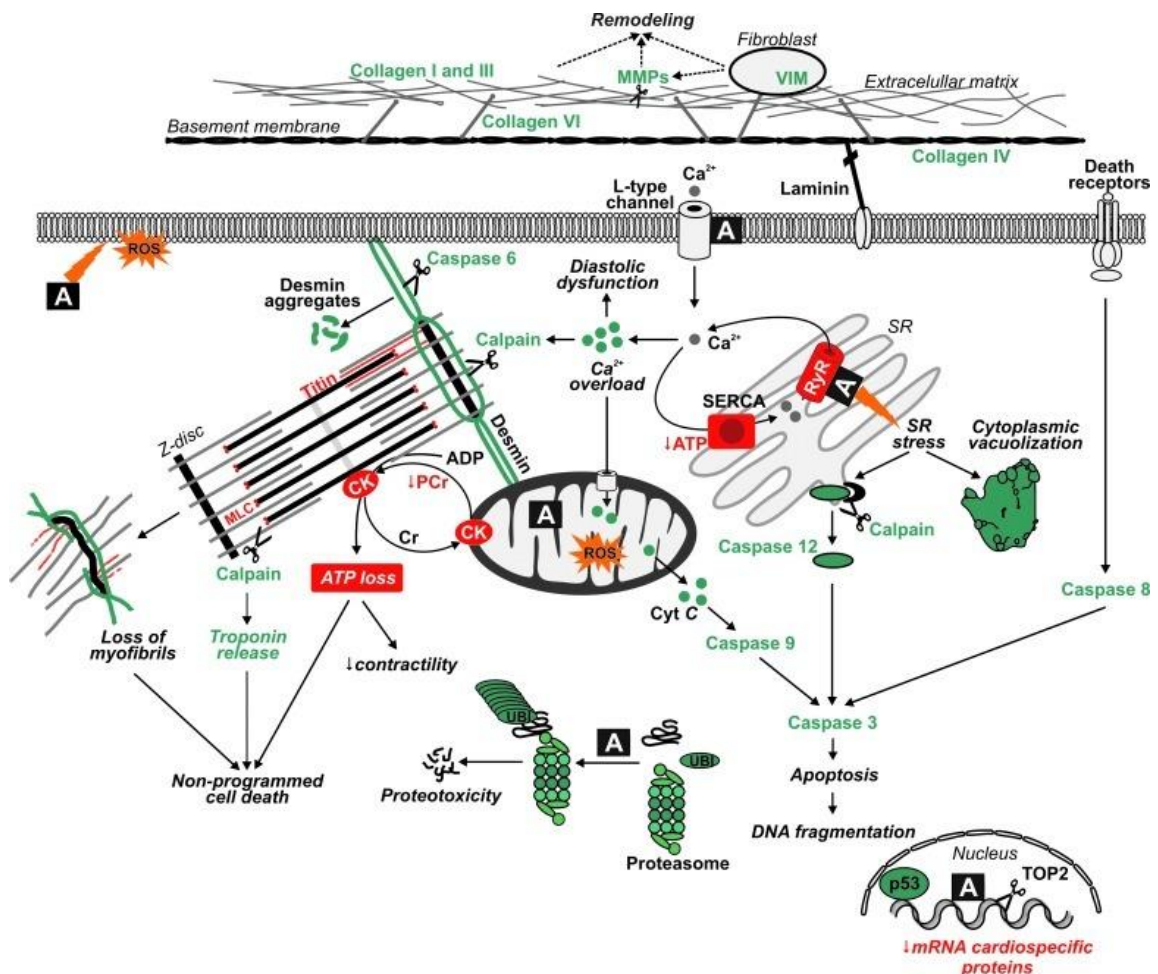


Figura 8. Descripción de los cambios moleculares asociados con el desarrollo de cardiotoxicidad de antraciclina. El color verde indica aumento, mientras que el color rojo ilustra disminución debido al tratamiento. A, antraciclina; C_iK, creatina quinasa; Cr, creatina; Cyt c, citocromo c; MLC, cadenas ligeras de miosina 1 y 2; MMP, metaloproteinasas; PCr, fosfocreatina; RyR, receptor de rianodina; SERCA, retículo sarco- / endoplásmico Ca²⁺ -ATPasa; SR, sarco- / retículo endoplásmico; ROS, especies reactivas de oxígeno; TOP2, topoisomerasa II; VIM, vimentina; UBI, ubiquitin. (Adaptado: Štěrba et al. 2013)

3.3 Ciclofosfamida

Forma parte de los fármacos alquilantes, es activado por la CYP2B en 4-hidroxíciclofosfamida y su tautómero aldofosfamida; ambos se transportan en la circulación a células tumorales, donde la aldofosfamida se segmenta espontáneamente y genera cantidades estequiométricas de mostaza fosforamida y acroleína. La mostaza fosforamida es la sustancia activa antitumoral, en tanto que la acroleína es la que produce los efectos adversos causantes de la cistitis hemorrágica. El reactivo intermediario mostaza fosforamida forma enlaces covalentes por alquilación de varias moléculas nucleofílicas, como los grupos fosfato, amino, sulfhidrilo, hidroxilo, carboxilo e imidazol. El átomo de nitrógeno 7 de la guanina es particularmente susceptible a la formación del enlace covalente, el cual representa el objetivo particular que determina su función biológica; también forma enlaces con el átomo de nitrógeno 6 de la guanina, el átomo de nitrógeno 1 y 3 de la adenina y el átomo de nitrógeno 3 de la citosina; cuales quiera de estos efectos explicaría adecuadamente tanto las lesiones mutagénicas como las citotóxicas de las células con índices mitóticos altos. Se desconoce el mecanismo real de la muerte celular, pero se cree se relaciona al reconocimiento por p53 del DNA extensamente dañado, bloqueándolas así en la interfase G1/S, desencadenando ya sea la reparación o produciendo apoptosis. La letalidad de la alquilación del DNA depende del reconocimiento del aducto (complejo de inclusión), la formación de roturas de la cadena de DNA por enzimas reparadoras y una respuesta apoptótica intacta. Las mutaciones de p53 conducen a resistencia al fármaco alquilante. Su eliminación se lleva a cabo mediante metabolismo hepático (Myers Jr & Chabner, 1990).

Los regímenes utilizados en cáncer de mama en terapia simple secuencial son de 600mg/m² I.V., cada 21 días; y en el régimen CEF, 75mg/m² oral por 14 días cada 28 días hasta repetir 6 ciclos. Las dosis previas, se han asociado con reacciones adversas severas, entre las que se encuentran:

- Mielo-supresión. – efecto dependiente de dosis que origina anemia, trombocitopenia y leucopenia, lo que conlleva a un alto riesgo de fiebre neutropénica, hemorragia o infecciones mortales. La inmunosupresión severa es

indicativa de interrupción en pacientes con cáncer, predisponiendo a la quimioresistencia múltiple (MDR) de células tumorales. Las células que poseen alta concentración de aldehído-deshidrogenasa (ALDH) pueden metabolizar la aldofosfamida a carboxifosfamida, agente inactivo, volviéndolas insensibles a los efectos citotóxicos; un ejemplo de ellas son las células madre de médula ósea. Por el contrario, los linfocitos maduros, entre otros tipos celulares, son blancos citotóxicos de la ciclofosfamida, debido a su baja cantidad de ALDH, motivo por el cual ésta es la quimioterapia de elección para prevenir la sensibilización y rechazo de trasplantes (Emadi et al., 2009).

- Cardiotoxicidad. – ocurre con dosis altas y se relaciona con daños en endotelio capilar y cardiomiocitos, lo que genera falla cardíaca congestiva, arritmias, bloqueos, miocarditis hemorrágica y hemopericardio.
- Infertilidad. – interfiere con la ovogénesis y la espermatogénesis, estos efectos suelen ser irreversibles. La falla ovárica se relaciona con la edad de inicio temprano y el uso acumulativo de dosis durante la enfermedad.
- Cistitis hemorrágica. – depende de la duración y el tiempo. Se utiliza Mesna, un agente detoxificante, y abundante hidratación para prevenir cistitis y posteriormente fibrosis de la vejiga. Los casos de cistitis hemorrágica se han asociado con malignidad (Emadi et al., 2009).
- Toxicidad pulmonar. – neumonitis y síndrome de distrés respiratorio agudo; si se presenta temprano (1-6 meses) puede ser reversible, si se suspende el tratamiento; si la aparición es tardía (meses-años) se asocia con adelgazamiento pleural y desarrollo de atelectasias, adelgazamiento irreversible de las paredes alveolares, que conllevan a una enfermedad pulmonar crónica obstructiva o EPOC (Sulkowska et al., 1998).
- Malignidades secundarias. – síndromes mieloproliferativos, cáncer de vejiga y malignidades linfoproliferativas han sido reportadas años después del uso de ciclofosfamida.

La ciclofosfamida ha demostrado inducir la producción de ROS en tejido pulmonar sano y ser el causante de la generación de las atelectasias y el distress respiratorio (Sulkowska et al., 1998). Una limitante conocida de la dosis, es también, la cardiotoxicidad inducida por ROS, la cual esta dada por los metabolitos HCY (4-hidroxi-ciclofosfamida) y acroleína (Kurauchi et al., 2017). Kurauchi y Nishikawa en 2017, demostraron que el uso de NAC inhibía la formación de ROS, incrementaba la actividad de ALDH (aldehído deshidrogenasa) y disminuía la presencia de acroleína, *in vitro*. La producción de ROS en células de cáncer de mama también se ha demostrado (Agrawal et al., 2017); en éstas la formación de ROS a largo plazo, conlleva a la formación de MDR (resistencia múltiple a drogas) (Cen et al., 2016), y la inducción de la expresión de genes relacionados con autofagia, la cual juega un papel crucial en la progresión del cáncer y la respuesta a la quimioterapia (Dewaele et al., 2010). Dewaele y cols. en 2010, demostraron que la inhibición de la autofagia temprana suprime la citotoxicidad de los agentes alquilantes; y que la inhibición de la autofagia tardía, la incrementaba, sugiriendo la participación de la autofagia temprana en la MDR de las células MCF-7 a la ciclofosfamida.

Se ha demostrado que algunos compuestos sensibilizan a las células de cáncer a la ciclofosfamida por medio de la generación de ROS y una producción de muerte por apoptosis, al activar p53 y la liberación de caspasa 3 dependiente de mitocondria. Tal es el caso de los compuestos con selenio Dimetil-fenil-seleniocianato, entre otros (Chakraborty et al., 2016). Concluyendo el beneficio de sinergizar el estrés oxidativo agudo causado por la ciclofosfamida en células tumorales.

4. IMMUNEPOTENT CRP

EL IMMUNEPOTENT CRP es un extracto dializable de una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular (<10 kDa) liberados por la desintegración de leucocitos de sangre o de tejido linfoide homogeneizado de bazo de bovinos. Este extracto dializable de leucocitos bovino (EDLb) contiene diferentes componentes y se ha demostrado que

varios de ellos (moléculas de un tamaño menor a 3,500 Da) son capaces de modificar la respuesta del sistema inmune (Medina-Rivero et al., 2014).

Originalmente fue descrito como factor de transferencia dializable y de composición núcleo-peptídica no antigénica, responsable de transferir inmunidad retardada (Kirkpatrick et al., 1972; Lawrence & Borkowsky, 1983). Sin embargo, el preciso mecanismo de acción del EDLb es aún desconocido. El efecto antígeno específico como el no específico ha sido reportado. El efecto de la actividad antígeno específico del EDLb conteniendo factor de transferencia, se indica por la habilidad de transferir hipersensibilidad de tipo retardada y reactivar la inmunidad celular y humoral. Los efectos no-específicos del EDLb incluyen el incremento de actividad quimio-táctica por monocitos y neutrófilos (Liu et al., 1984).

Se ha observado que incrementa la población de linfocitos T, células dendríticas y NK (efectores más potentes en la respuesta antitumoral del hospedero), por lo que se ha considerado como un agente inmunológico en la inmunoterapia del cáncer. Algunos de los efectos benéficos de su uso se han observado en ensayos clínicos realizados en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde se ha encontrado que ejerce un efecto protector sobre células de la médula ósea, manifestado en la cuenta total de linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B CD29+ y células NK, incluso con cifras mayores comparadas al control, al administrarse en conjunto (adyuvante) con la quimioterapia en pacientes con cáncer de mama y cáncer de células pequeñas de pulmón; observando también un aumento en la concentración sérica de IL-3 e IL-7 (LARA et al. 2010; Franco-Molina et al. 2008). En estos estudios, se encontró como hallazgo, una reducción importante en el tamaño de tumores metastásicos por imagen pet-scan, así como una mejoría en el desempeño en la escala de Karnofsky.

In vitro se ha evidenciado que el ICRP induce efectos citotóxicos frente diferentes líneas tumorales, incluyendo las líneas de cáncer de mama: MCF-7, BT-474 y MDA-MB-453, clasificadas como luminal A, luminal B y HER2neu-enriched. Se ha demostrado también, que induce en MCF-7 la expresión de proteínas pro-apoptóticas TP53, bag-1, c-myc, bax, bcl-2 y bak, suprimiendo la expresión del mRNA de los genes p53, lo que sugiere una

muerte por apoptosis; sin afectar la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica (Franco-Molina et al., 2006). Posteriores estudios demostraron que es capaz de bloquear la actividad de unión del AP-1 a DNA en células MCF-7, inhibiendo la expresión de diversos factores de transcripción encargados de la proliferación y diferenciación (Mendoza-Gamboa et al., 2008). Modelos tanto *in vitro* como *in vivo* han mostrado su eficiencia en contra de melanoma murino, en el que favorece la sobrevida, regresión tumoral y prevención de metástasis (Franco-Molina et al., 2010). Recientes estudios han evidenciado que la muerte celular inducida en células de cáncer cervicouterino HeLa, es dependiente de ROS (Martínez-Torres et al., 2018). En relación con la quimioterapia, ha demostrado inducir mieloprotección en modelos murinos tratados con 5-fluoracilo, reduciendo la producción de ROS/superóxido y Nrf2 en células de médula ósea, manteniendo una cuenta de leucocitos, granulocitos y eritrocitos séricos normales (Coronado-Cerda et al., 2016). Sin embargo, su contribución antitumoral en combinación con la quimioterapia no se ha estudiado aún.

5. Terapia Múltiple e interacción farmacológica

El uso de múltiples fármacos puede dirigirse a múltiples blancos, a múltiples subpoblaciones, o a múltiples enfermedades, simultáneamente. Fármacos con diferentes mecanismos o modos de acción, pueden también dirigir su efecto a un solo objetivo o una enfermedad, y tratarla más efectivamente. Este efecto conjunto se denomina sinergismo, y es la base en la cual, se fundamenta las terapias combinacionales. Los posibles resultados favorables del sinergismo son:

- Incremento del efecto terapéutico.
- Decremento de la dosis, pero incremento o mantenimiento del mismo efecto terapéutico, aboliendo toxicidad.
- Minimizar o disminuir el desarrollo de resistencia medicamentosa.
- Y, sinergismo selectivo contra objetivo (sinergismo de eficacia) y no frente al huésped (antagonismo de toxicidad).

Por estos beneficios terapéuticos, la terapia combinacional ha sido ampliamente usada, y se ha convertido en la principal opción para tratar enfermedades devastadoras, como lo son el cáncer, VIH, entre otras.

Se conoce como interacción farmacológica a la modificación del efecto de un fármaco por la acción de otro cuando se administran de manera conjunta. La clasificación general de las interacciones químicas busca valorar principalmente el efecto neto ejercido sobre un elemento (ya sea a la salud, el ecosistema, células, etc.); más que preocuparse por las interacciones químicas por sí mismas (Tallarida 2002). Este sistema las clasifica en efectos:

- *Aditivo*. - es un efecto combinado de 2 o más sustancias químicas que equivale a la suma de los efectos aislados de cada una de ellas, es como sumar $2+2=4$.
- *Sinergismo*. - supone un efecto combinado de 2 o más sustancias químicas que es mucho mayor que la suma de los efectos de cada sustancia por sí sola; o sea, $2+2=10$. En la búsqueda de incrementar el efecto terapéutico de la quimioterapia con menores dosis, múltiples estudios de terapias combinatorias han sido publicados bajo este término.
- *Potenciación* es un tipo particular de sinergia en la que una sustancia que no ejerce efecto alguno en determinada zona corporal aumenta los efectos terapéuticos de otra sustancia en dicha zona, por ejemplo: $0+2=10$.
- *Antagonismo*. - 2 o más sustancias químicas interfieren en las acciones de cada una de ellas; o bien una interfiere con la acción de la otra, por lo que el efecto combinado es menor que la suma de los efectos químicos individuales, $2+2=3$. También puede expresarse como un efecto contrario de la potenciación $0+4=1$; o un antagonismo en el cual ambas sustancias se cancelan entre sí: $-4+4=0$.
- *Tolerancia*. - es un tipo de antagonismo que resulta en la disminución de los efectos de una sustancia química, debido a una exposición previa con la misma sustancia u otra estructuralmente relacionada.
- *Sensibilidad*. - es un tipo de agonismo que resulta del aumento de los efectos de una sustancia química, debido a una exposición previa con la misma sustancia u otra estructuralmente relacionada.

Algunos estudios evidencian un incremento del efecto antitumoral de la quimioterapia al combinarse con otra sustancia *in vitro*, denominando a tal hallazgo potenciación o sinergismo, manejándolo como sinónimos sin una definición clara entre estos. Tal es el ejemplo del incremento citotóxico de la ciclofosfamida y el 5-fluoracilo por la insulina (Agrawal et al., 2017), de la poliquimioterapia CEF por la metformina (Soo et al., 2015), del tamoxifeno por el transilat (Ghanbari, 2013), de la ciclofosfamida por el resveratrol (Singh et al., 2009), entre muchos otros estudios. La falta de una definición clara de sinergismo no permite dilucidar en ninguno de ellos la reducción en la dosis de quimioterapia lograda, incrementando la controversia de los resultados presentados por distintos grupos de investigación.

En un intento por unificar el concepto, Chou inició en los ´70s, la creación de un modelo matemático que sustituyese los modelos típicos de regresión (ej. Probit), por uno que integrase principios físico-químicos y biológicos, como lo son: la ecuación de la cinética enzimática de Michaelis Menten, la ecuación de orden superior para la saturación de unión a ligando de Hill, la ecuación para la ionización de pH de Henderson-Hasselbalch, la ecuación para la unión al receptor de Scatchard, entre otros. La inducción y deducción matemática de las ecuaciones previas en una sola ecuación, guiado por la ley general de acción de masas, creó la *ecuación del efecto-medio* (2) (Chou, 1976). La ecuación, también denominada *teoría general dosis-respuesta*, brinda al igual que los modelos de regresión, la posibilidad de determinar el efecto (inhibición/citotoxicidad) de innumerables concentraciones sin necesidad de llevarlas a cabo; sin embargo, a diferencia del modelo en línea recta de la regresión, la *teoría dosis-respuesta*, genera curvas no-rectas que reflejan el comportamiento biológico real ante los tratamientos. La ecuación del efecto-medio, describe la relación dosis-respuesta de la manera más simple con la ecuación: (Chou, 1976)

$$fa/ fu = (D/Dm)^m \quad (1)$$

Donde:

fa=fracción afectada.

fu=fracción no afectada.

D= dosis o concentración del medicamento.

D_m es la dosis media (IC_{50} , ED_{50} , o DL_{50}) que inhibe el sistema en estudio un 50%, también denominada potencia media.

$m=1$, >1 , <1 , indican curvas: hipérbolicas, sigmoidales o sigmoidales planas, respectivamente.

Al graficar $x=\log(D)$ contra $y=\log(f_a/f_u)$, basado en la forma logarítmica de la ecuación (1), se forma la denominada *gráfica del efecto-medio* (Chou, 1976), donde:

$$\log f_a/f_u = m \log(D) - m \log(D_m) \quad (2)$$

Existen 3 tipos de curva: sigmoidea, plana-sigmoidea e hipérbolica, dependiendo si la pendiente (m) es $m>1$, $m<1$ ó si $m=1$, respectivamente, a través de las cuales se obtienen las CI o CC (concentraciones inhibitorias y concentraciones citotóxicas). El grado en el que la curva se ajusta a la nube de puntos, o bondad de ajuste, se denomina Coeficiente de Correlación (r). Esta medida de ajuste, toma valores que van de 0 a 1, y nos permite pronosticar el grado en que la variable dependiente (inhibición/muerte) se correlaciona con la variable independiente (tratamiento). Para efectos prácticos, en estudios *in vitro* se establece como nivel de conformidad un estándar mayor al 0.90.

Posterior a la generación de la *ecuación del efecto-medio* (2), se derivó e introdujo la *ecuación del efecto-de múltiples drogas* en 1981, por Chou y Talalay; extendiendo el estudio dosis-respuesta de una sola droga a una para múltiples. Por lo tanto, para la combinación de 2 drogas, por ejemplo, en un sistema de primer orden (cuando $m=1$), se obtiene la fórmula (3) (Chou & Talalay 1981; Chou & Talalay 1984; Chou & Talalay 1983):

$$\frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} = \frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} + \frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2} \quad (3)$$

Y cuando $m \neq 1$ (4):

$$\left[\frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} \right]^{1/m} = \left[\frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} \right]^{1/m} + \left[\frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} \right]^{1/m} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2} \quad (4)$$






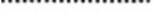





Cuando 2 drogas son combinadas y sujetas a diluciones seriadas, la mezcla combinada de ambos se comporta como una tercera droga para el efecto dosis-respuesta. Gracias a ello y basado en las ecuaciones (3) y (4), Chou y Talalay en 1983 introdujeron el término *índice de combinación (CI)*, el cual es una medida cuantificable del sinergismo o antagonismo de 2 o más drogas:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} = \frac{(D)_1}{(D_m)_1 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_1}} + \frac{(D)_2}{(D_m)_2 [f_a / (1 - f_a)]^{1/m_2}} \quad (5)$$

Donde, en el denominador: $(D_x)_1$ representa D_1 , o el % del sistema inhibido de manera “individual”, lo mismo para $(D_x)_2$, con respecto a D_2 . En el numerador, $(D)_1 + (D)_2$, representa el % de inhibición de la combinación. Si la suma de estas fracciones es igual a 1, se dice que es aditivo; si la suma de **IC** es menor a 1, se describe sinergismo; y si el valor de **IC** es mayor a 1, se indica antagonismo. Los valores de sinergismo van de 0 a 1, y de antagonismo de 1 al infinito (∞) (**Tabla 7**). La ecuación fundamental dosis- efecto, así como los teoremas arriba descritos, son independientes: *i*) del número de reactantes (substratos, productos e inhibidores); *ii*) del mecanismo de acción (orden secuencial, ping-pong o aleatorizado); *iii*) y del tipo de inhibición (competitivo, no-competitivo o incompetitivo).

A través del Software Compusyn[®], creado por Chou y Martin en 2005, se logra la integración de los modelos matemáticos de Chou, logrando la cuantificación de sinergismo/antagonismo de una terapia múltiple de drogas de manera automatizada; teniendo además la capacidad de brindar la cantidad en la reducción de dosis de quimioterapia lograda, a través del término *DRI* (Dose Reduction Index).

Tabla 7. Cuantificación de sinergismo y antagonismo.

Range of Combination Index	Description	Graded Symbols	Graphic Symbols
<0.1	Very strong synergism	+++++	
0.1–0.3	Strong synergism	++++	
0.3–0.7	Synergism	+++	
0.7–0.85	Moderate synergism	++	
0.85–0.90	Slight synergism	+	
0.90–1.10	Nearly additive	±	
1.10–1.20	Slight antagonism	–	
1.20–1.45	Moderate antagonism	– –	
1.45–3.3	Antagonism	– – –	
3.3–10	Strong antagonism	– – – –	
>10	Very strong antagonism	– – – – –	

A través del uso del índice de combinación se cuantifica el grado de sinergismo/antagonismo, o se clasifica en aditivismo, la interacción entre 2 o más medicamentos en un sistema biológico (Chou, 2007).

1. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento en la tasa de mortalidad por cáncer de mama, y a la falta de tratamientos efectivos, se ha propuesto la terapia combinacional como una alternativa para aumentar la efectividad de la quimioterapia, única opción terapéutica que prolonga la sobrevida en el subtipo molecular triple-negativo, al igual que en etapas avanzadas en el resto de subtipos. La justificación de nuestro trabajo es utilizar el IMMUNEPOTENT CRP como una sustancia que en combinación con la quimioterapia de primera-línea en cáncer de mama incrementará de manera sinérgica el efecto citotóxico de ésta. Esto brindará la posibilidad, al disminuir las dosis requeridas, de prevenir los efectos adversos de manera indirecta, y de manera directa también, al presentar propiedades de factor de transferencia, adyuvantes del sistema inmune, como ya se ha observado en clínica. Con ello se pretende abrir paso a nuevos estudios para la aplicación en clínica de concentraciones antitumorales de I-CRP, que logren disminuir las dosis de quimioterapia ejerciendo un mejor resultado antitumoral.

2. HIPÓTESIS

El IMMUNEPOTENT CRP induce muerte celular regulada dependiente de ROS, e incrementa sinérgicamente la citotoxicidad inducida por la ciclofosfamida o la epirubicina en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama.

3. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar si el I-CRP induce una muerte dependiente de ROS en MCF-7 y MDA-MB-231; y determinar su efecto sinergista, aditivo, o antagónico, en combinación con ciclofosfamida o epirubicina en células MCF-7 y MDA-MB-231 de cáncer de mama.

5.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar el efecto del I-CRP sobre la actividad metabólica de células MCF-7 y MDA-MB-231.
2. Determinar si el I-CRP induce la muerte de células MCF-7 y MDA-MB-231.
3. Determinar si el I-CRP induce daño mitocondrial y la formación de especies reactivas de oxígeno en MCF-7 y MDA-MB-231.
4. Evaluar la participación de las especies reactivas de oxígeno en la muerte celular causada por el I-CRP en células MCF-7 y MDA-MB-231.
5. Evaluar el efecto de la ciclofosfamida y epirubicina sobre la actividad metabólica de MCF-7 y MDA-MB-231.
6. Determinar si la ciclofosfamida y la epirubicina inducen muerte de células MCF-7 y MDA-MB-231.
7. Determinar las concentraciones inhibitorias y citotóxicas del I-CRP, la ciclofosfamida, y la epirubicina en MCF-7 y MDA-MB-231.
8. Determinar el efecto sinergista, aditivo o antagónico en la actividad metabólica de MCF-7 y MDA-MB-231 del I-CRP en combinación a radios no constantes y constantes con ciclofosfamida o epirubicina.
9. Analizar si el efecto sinergista, aditivo o antagónico es debido a la muerte celular.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Mantenimiento de las líneas celulares

Se obtuvieron las líneas celulares: MCF-7 (ATCC® HTB-22™) y MDA-MB-231(ATCC® HTB-26™), de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (Medio esencial mínimo modificado por Dulbecco/ mezcla nutricional, GIBCO® by Life Technologies) suplementado con Suero Fetal Bovino inactivado al 10% (GIBCO by Life Technologies), y antibiótico-antimicótico 100X al 1% (GIBCO® by Life Technologies). Se mantuvieron en cajas de cultivo de 75cm² (CORNING®), bajo una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y temperatura de 37°C.

Para realizar el mantenimiento, después de retirar el medio DMEM, se hizo un lavado del frasco utilizando buffer de fosfatos salinos (PBS) a un pH de 7.4, posteriormente se añadió tripsina-EDTA (GIBCO®) al 1%, dejándola actuar por 5 minutos a 37°C. Por último, se añadió medio DMEM para inactivar la tripsina y se realizó un conteo de células tiñendo éstas con azul tripán (solución 0.4% SIGMA ALDRICH®). Se contaron en una cámara de Neubauer observándolas en un microscopio óptico (ZEISS PRIMO STAR) siguiendo el protocolo establecido por la American Type Culture Collection (ATCC).

4.2 Elaboración de IMMUNEPOTENT CRP

El Extracto Dializable de Leucocitos Bovino (producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México) es un producto de un peso molecular de 10-12 kDa, elaborado a partir del homogenizado del bazo de bovinos sanos y linfocitos de sangre periférica, dializados, liofilizados y posteriormente sometidos a pruebas de esterilidad (inoculación de ratones *in vivo*, cultivo en diversos medios de cultivo, y determinación de endotoxinas mediante la prueba de *Limulus* del lizado de amebocitos (LAL) (Endotoxin-

Kit-Timed Gel Formation, SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO, USA), libre de la presencia de pirógenos endógenos y bacterias. Se empleó un solo lote de bDLE para todos los experimentos realizados. El bDLE obtenido de 1.5×10^9 leucocitos (definido como una unidad; 1U) fue disuelto en medio suplementado DMEM/F12 en un volumen de 0.25 mL, y filtrado con filtro $.22\mu\text{m}$ (ThermoFisher®) antes de su uso. Se almacenó en frío, a 4°C, hasta su utilización.

4.3 Quimioterapia

Se utilizaron los siguientes agentes quimioterapéuticos: Hidrofosmin® conteniendo 200 mg de ciclofosfamida monohidratada, concentración final 20mg/mL (Sanfer SA de CV, Naucalpan de Juárez, Edo. México, México); y Farmorubicin® RD, conteniendo 10mg de epirubicina, concentración final 2mg/mL (Pfizer SA de CV, Ciudad de México, México). El polvo conteniendo 200mg de Hidrofosmin®, se reconstituyó en 10 mL de medio complementado DMEM/F12, obteniendo una concentración molar final de 76.6049 mM; se almacenó en frío a 4°C, protegido de la luz, hasta su utilización, durante un período no mayor a 4 semanas. El polvo conteniendo 10 mg de Farmorubicin® RD, se disolvió en 5 mL de agua inyectable, obteniendo una concentración molar final de 3,679.8 μM ; almacenándolo en frío a 4°C, protegido de la luz, hasta su utilización, por un período no mayor a 2 semanas.

4.4 Cálculo de la relación dosis-respuesta de los tratamientos

Posterior al conteo, las células MCF-7 se diluyeron en 100 μL de DMEM/F12 en una densidad de 5×10^3 células/pozo, y las células MDA-MB-231 a una densidad de 7×10^3 células/pozo, en placas planas transparentes de 96 pozos (PS, CORNING®); dejando incubar durante la noche para su correcta adhesión, bajo una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , a 37°C. Veinticuatro horas después, el sobrenadante fue removido y las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de I-CRP (0.5-2.5 UI/mL),

ciclofosfamida (5-50mM) o epirubicina (2-400μM), ajustando las concentraciones a un volumen final de 200μL/pozo; aforando, sí necesario, con medio DMEM/F12. El tratamiento se dejó actuar por 24 horas, al término del cual, se desechó invirtiendo la placa. No se realizó lavado. Las células viables que continuaban adheridas fueron inmediatamente incubadas con 100μL de DMEM/F12 adicionado con 20μL de resazurina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), durante 4 horas. La resazurina en polvo, se preparó previamente en PBS, a una concentración de 0.15mg/mL, y se esterilizó utilizando un filtro de .22 μm (CORNING®), según lo especificado por Riss y *col*, 2015. La fluorescencia emitida por la resorufina (producto final de la reducción enzimática de resazurina por células viables) (**Fig. 9**), fue captada por filtros de fluorescencia mediante un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek®) a una longitud de onda de excitación de 530/25 nm y de emisión de 590/25 nm (O'Brien et al., 2000). La fluorescencia emitida por el tratamiento y por el medio de cultivo (blancos), se restó de la fluorescencia total. La viabilidad expresada en porcentaje corresponde al valor medio de tres experimentos diferentes (3 repeticiones por experimento), considerando la fluorescencia del control, el 100% de viabilidad. Posteriormente se calculó la inhibición, la cual corresponde a la diferencia de restar la viabilidad al 100%. La curva inhibitoria fue ingresada al software Compusyn®, donde la relación dosis-respuesta fue arrojada mediante las concentraciones inhibitorias (IC), como se explica más adelante.

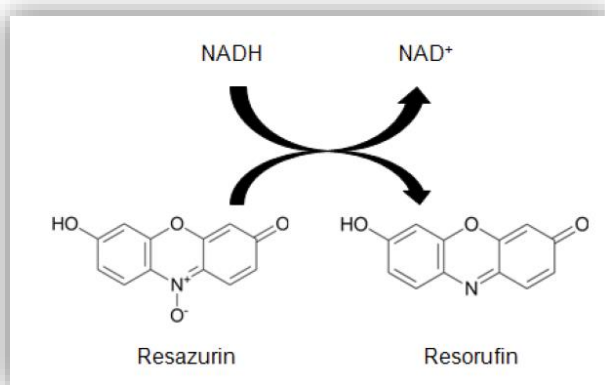


Figura 9. Conversión enzimática de la resazurina a resorufina por células viables. Fuente:(O'Brien et al., 2000)

4.5 Determinación y cuantificación de sinergismo, aditivismo o antagonismo.

Se utilizó el software Compusyn[®], para la obtención de los índices de cuantificación (CI) (Tabla 7).

La descripción gráfica de sinergismo, antagonismo o aditivismo se graficó mediante un *Isobolograma*, el cual representa la suma equipotente de las dosis de ambos fármacos y su efecto (**CI**), y su construcción corresponde el lado contrario de la moneda del gráfico Fa-CI.

Se requiere conocer previamente el efecto (inhibitorio/citotóxico) de un mínimo de 2 concentraciones por cada tratamiento; así como el efecto (inhibitorio/citotóxico) de al menos un tratamiento combinado. Al ingresar los datos anteriores, el software determinará los parámetros **Dm** y **m** de manera automática, brindando la ecuación y la gráfica dosis-efecto para cada tratamiento, lo que permite determinar las concentraciones inhibitorias en todos los niveles de efecto (IC del 1 al 100). Posteriormente arrojará la gráfica Fa-CI plot, el isobolograma, el **CI** y el **DRI** de las combinaciones realizadas. El DRI, representa las veces que el tratamiento puede ser reducido en la combinación para lograr el mismo efecto que obtendría por sí sólo. Los datos ingresados representan el promedio de 3 experimentos diferentes o más, realizados por cuádruplicado.

4.6 Diseño de combinaciones

Chou y Talalay, recomiendan que el radio de combinación de 2 fármacos sea mantenido a un radio equi-potente o constante (IC₅₀ del fármaco A & IC₅₀ del fármaco B), ó, a un radio no-constante o desigual, manteniendo la misma concentración de uno e incrementando paulatinamente la del otro (IC₁ del fármaco A & IC₁, ó IC₁₀, ó IC₂₅, ó IC₅₀, ó IC₇₀, etc. del fármaco B), de tal manera que se pueda determinar el patrón que ejerce un fármaco sobre otro a distintas concentraciones.

En este estudio se tomó como fármaco A al I-CRP y al fármaco B la quimioterapia (epirubicina o ciclofosfamida). Se diseñaron combinaciones a radios no-constantes, utilizando una concentración constante correspondiente a la IC₁ del fármaco A con

concentraciones crecientes del fármaco B (IC_{10} , IC_{20} , IC_{30} , IC_{40} ó IC_{50}); y visceversa, concentración constante (IC_1) del fármaco B con concentraciones crecientes del fármaco A (IC_{10} , IC_{20} , IC_{30} , IC_{40} ó IC_{50}). Se tomó la concentración constante IC_1 debido al interés particular de demostrar la posibilidad de un efecto benéfico con el requerimiento mínimo de quimioterapia, con nulos efectos secundarios, economizando al máximo también el uso del I-CRP. De no demostrar un efecto benéfico aceptable, se estudiarán, además, el efecto de combinaciones equi-potentes o constantes (**Fig. 9**) y no constantes variables diferentes a la IC_1 .

Para determinar el efecto de las combinaciones sobre la inhibición celular se utilizó el método de Alamar blue. Se sembraron 7,000 células/pozo MDA-MB-231 y 5,000 células/pozo de MCF-7, en placas planas de 96 pozos, y posterior a un período de incubación para la correcta adhesión, ambos fármacos (I-CRP & ciclofosfamida/ I-CRP & epirubicina) fueron aplicados al mismo tiempo, ajustando la dosis a un volumen final de 200 μ L. Posterior a 24 hrs. de tratamiento, el sobrenadante fue desechado invirtiendo la caja. Inmediatamente después se colocó 100 μ L de medio adicionado con 20 μ L de resazurina (1.15mg/mL), dejándose incubar por 4 horas. La viabilidad fue determinada mediante un lector de placa multi-modal SynergyTM HTX, con filtro de fluorescencia, a una longitud de onda de excitación de 530/25 nm y de emisión de 590/25 nm. La viabilidad posterior al tratamiento combinado fue determinada según el control, el cual se tomó como el 100% de viabilidad. La inhibición se calculó indirectamente restando 100 al porcentaje de viabilidad relativa dada.

4.8 Análisis por citometría de flujo.

La citometría de flujo es una tecnología biofísica que utiliza luz láser para el recuento y clasificación de células de acuerdo con sus características morfológicas o presencia de marcadores de superficie e intracelulares. En esta técnica las células se mantienen suspendidas en un fluido y atraviesan un tubo sobre el que incide un rayo de luz láser; la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se detecta, y las

sustancias químicas fluorescentes que se encuentran dentro o adheridas a la célula son excitadas hasta emitir luz a una longitud de onda mayor que la de la fuente de excitación, la fluorescencia también es recogida por los detectores; permitiendo inferir tamaño, complejidad y características físicas y químicas de las células individualmente.

Para alcanzar los objetivos propuestos, se han seleccionado los fluorocromos:

1. Anexina V y yoduro de propidio (Análisis de muerte celular). Canal FL4 Y FL2 respectivamente.
2. TMRE (Análisis de potencial de membrana mitocondrial). Canal FL3.
3. DCFDA (Análisis de las especies reactivas de oxígeno). Canal FL3.

Para cada uno de los marcajes se realizaron al menos tres experimentos independientes hechos en triplicado por tratamiento. Todos los datos obtenidos por ensayos en citometría de flujo fueron analizados utilizando el software FlowJo.

4.8.1 Análisis de muerte celular en MCF-7 y MDA-MB-231.

Para los ensayos de citometría de flujo se sembraron 5×10^4 células/pozo en un volumen de 400 μ L en placas planas de 24 pozos (CORNING®). Las placas de cultivo se incubaron por 24 hrs. a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO₂ para permitir que las células se adhieran a la placa.

Para medir la muerte celular inducida tanto por los tratamientos individuales como por los combinados, se marcaron las células con anexinaV (AnnV) unida a alofococianina (ANN-APC) (Molecular probes® by Life technologies™) y yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) (Molecular probes® by Lifetechnologies™). La AnnV tiene afinidad por la fosfatidilserina, un fosfolípido que usualmente se mantiene en la monocapa lipídico interior, pero cuando una célula sufre apoptosis la fosfatidilserina queda expuesta a la superficie de la célula, funcionando como una señal cómete para fagocitos y células vecinas; por otro lado la tinción con PI permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido (muerte celular).

En este ensayo las células obtenidas en el paso de la recuperación fueron marcadas agregando 100 μ L de tampón de unión de anexina (ABB) (HEPES al 10 mM, NaCl al 140Mm, CaCl₂ al 2.5 mM, y Ph al 7.4), ANN-APC (2.5 μ g/mL) (Molecularprobes® by

Life technologies™) y PI (0.5µg/mL) (Molecular probes® by Lifetechnologies™). Incubando los tubos durante 30 minutos a 4°C, posteriormente, se analizaron por la técnica de citometría de clasificación de células marcadas por fluorescencia (FACS) (BD Accuri™ C6 Flow Cytometer) utilizando los canales FL-4 para anexina y FL-2 para yoduro de propidio. Posteriormente, los resultados en la muerte de distintas concentraciones del tratamiento individual, fue ingresado al software Compusyn®, de donde se obtuvieron las concentraciones citotóxicas (CC) en todos los niveles, necesarias para llevar a cabo las combinaciones.

4.8.2 Evaluación de la pérdida de potencial de membrana mitocondrial

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó el marcaje TMRE (Etil éster tetrametilrodamina), un fluorocromo que en células con potencial de membrana mitocondrial intacto es secuestrado. Cuando las mitocondrias pierden su potencial de membrana, el TMRE es liberado de la membrana, lo que produce un cambio en la intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 535 nm, respectivamente), el cual es medido mediante citometría de flujo en el canal FL-3. Para este ensayo, las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^4 células/pozo, en placas de 24 pozos, y tratadas con la CC₅₀ de I-CRP durante 24 hrs. También se realizaron repeticiones de células control y con tratamiento pre-tratadas con 10mM de NAC (8µL), durante media hora, antes de colocar el tratamiento. Posteriormente se recuperaron las células y se centrifugaron a 1600 rpm por 10 minutos. Se decantaron y se utilizaron 200 µL de buffer (200 µL de PBS y 4 µL de TMRE) por muestra, correspondiente a 50nm de TMRE, en una atmósfera de 37°C y 5% CO₂, durante 30 minutos, para realizar el marcado de la membrana mitocondrial. Al finalizar el tiempo de incubación, cada muestra se diluyó en 800 µL de PBS, y se centrifugó nuevamente a 1600 rpm por 10 minutos. Se decantó y se agregó, posteriormente, 100 µL de PBS, para determinar finalmente la fluorescencia emitida mediante el citómetro de flujo por FACS (BD Accuri TM C6 Flow cytometer), utilizando el canal FL-3. Los datos arrojados, fueron analizados posteriormente mediante el software FlowJo.

4.8.3 Análisis de las especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para evaluar la cantidad de especies reactivas de oxígeno generadas dentro de cada célula, se utilizó el marcaje DCFDA (2',7' -diclorofluoroscein diacetato también conocido como H2DCFDA), un agente fluorescente permeable a través de la membrana celular que mide la actividad de hidroxilo, peroxilo, entre otras especies reactivas de oxígeno dentro de la célula. Después de difundir hacia el interior de la célula mediante diferencias de cargas, es desacetilado por esterasas celulares en un componente no fluorescente, que más tarde es oxidado por ROS en 2',7' -dichlorofluorescein (DCF). DCF es un componente altamente fluorescente (longitud de onda de excitación y de emisión de 485 y 535 nm, respectivamente) que puede ser detectado mediante citometría de flujo por FACS (BD Accuri TM C6 Flow cytometer), en el canal FL-1. Para este ensayo las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^4 células/pozo, en placas de 24 pozos, y tratadas también con la CC_{50} de I-CRP durante 24 hrs. También se realizaron repeticiones de células control y con tratamiento pre-tratadas con 10mM de NAC (8μL), durante media hora, antes de colocar el tratamiento. Se aplicaron 25μM de DCFDA por pozo, en una atmósfera de 37°C y 5% CO₂, protegido de la luz, durante 45 minutos, para realizar el marcado de ROS. Al finalizar el tiempo de incubación, se llevó a cabo la recuperación de células, y se centrifugó a 1600 rpm por 10 minutos. Posteriormente se decantó el sobrenadante y cada muestra se diluyó en 800 μL de PBS, posterior al cual se centrifugó nuevamente a 1600 rpm por 10 minutos. Se decantó y se agregó, finalmente, 100 μL de PBS, para determinar la fluorescencia emitida mediante el citómetro de flujo. Los datos arrojados, fueron analizados posteriormente mediante el software FlowJo.

4.9 Análisis estadísticos

La media de las variables obtenidas en los ensayos de inhibición y muerte, potencial de membrana mitocondrial y ROS (tres experimentos realizados por triplicado), fueron ingresados al software GraphPad Prism 7, donde se realizó un análisis de varianza ANOVA, para la normalización de los datos; y posteriormente una prueba de Tukey, para comparación de las medias, considerando significativo una diferencia con una $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 El I-CRP ejerce un efecto antitumoral en células MCF-7; así como también, en células MDA-MB-231 “triple negativo” de cáncer de mama.

Utilizando el método de Alamar Blue® (resazurina), se determinó el efecto del I-CRP sobre la actividad metabólica en ambas líneas tumorales. Posteriormente, se estudió el efecto de tales concentraciones sobre la muerte celular mediante la tinción con Ann/IP. Los resultados mostraron que el I-CRP disminuye la actividad metabólica de MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo” de manera dependiente de dosis. Por otro lado, la disminución en la viabilidad se correlacionó con un incremento en la muerte celular, siendo MDA-MB-231 “triple negativo” más sensible al I-CRP en comparación con MCF-7. Tratar durante 24 hrs con I-CRP, arrojó una IC₅₀ de 0.90 UI/mL, y una CC₅₀ de 1.32 UI/mL en MDA-MB-231 (**Fig. 10 A, B**). Mientras que en MCF-7, se obtuvo una IC₅₀ de 1.30 UI/mL, y un CC₅₀ de 1.42 UI/MI, significativamente diferentes entre ambas líneas tumorales (**Fig. 10 A, B**).

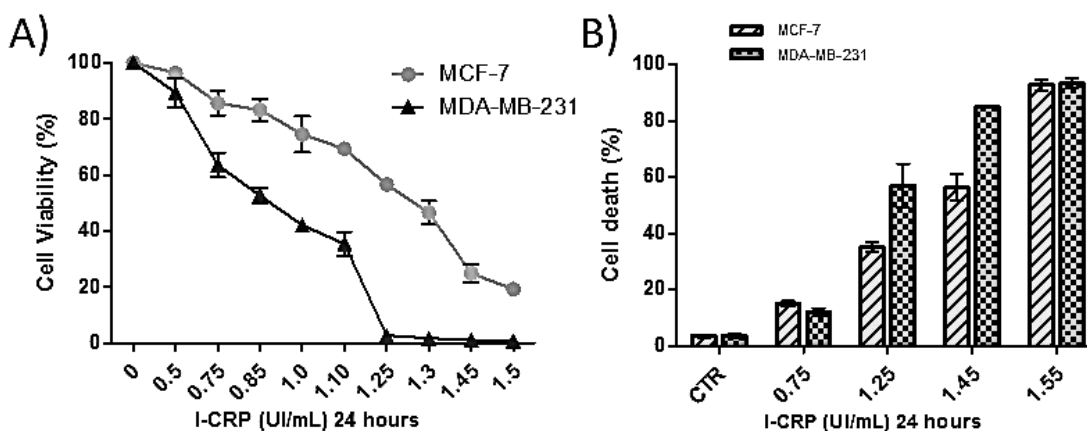


Figura 10. Efecto sobre la viabilidad y la muerte celular del tratamiento con I-CRP. MCF-7 (gris) y MDA-MB-231 (negro) fueron tratadas con diferentes concentraciones de I-CRP durante 24 hrs. **(A)** Viabilidad relativa determinada mediante Alamar blue (resazurina) y expresada mediante porcentaje, considerando la fluorescencia emitida por el control como el 100%. **(B)** La muerte celular fue analizada mediante citometría de flujo utilizando el marcaje Ann/PI. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE.

5.2 El I-CRP induce estrés oxidativo en células MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.

El tratamiento con la CC_{50} de I-CRP durante 24 hrs indujo en MCF-7 una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial comparado al control ($70.7 \pm 6.9\%$ & $3.55 \pm 0.2\%$) $P < 0.0001$ (**Fig. 11 C, D**), e incrementó la producción de especies reactivas de oxígeno ($37.56 \pm 3.5\%$ & $1.7 \pm 1.1\%$) $P < 0.0005$ (**Fig. 11 A, B**). En células MDA-MB-231 “triple negativo” se observó el mismo efecto, obteniendo una pérdida de potencial de membrana de $63.6 \pm 0.70\%$ (control $5.57 \pm 3.64\%$) $P < 0.0001$ (**Fig. 11 C, D**), y un incremento de ROS de $70.67 \pm 5.62\%$ (control $1.57 \pm 1.18\%$) $P < 0.0005$ (**fig. 11 A, B**). Dosis equipotentes de I-CRP producen mayor cantidad de ROS en células MDA-MB-231 “triple negativo” que en MCF-7 ($P < 0.0001$); sin embargo, la pérdida de potencial de membrana mitocondrial es la misma en ambas líneas tumorales.

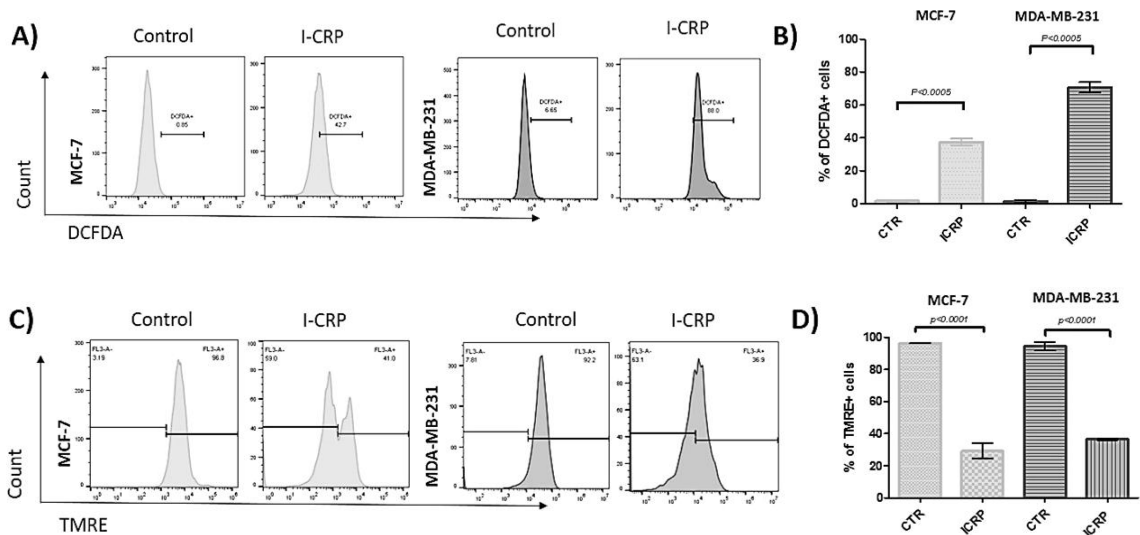


Figura 11. Daño mitocondrial e inducción de ROS por el I-CRP. (A, C) Histogramas obtenidos mediante citometría de flujo 24 hrs después del tratamiento con 1.41 UI/mL (MCF-7) y 1.32 UI/mL (MDA-MB-231) de I-CRP, respectivamente. (A) Los niveles de ROS fueron detectados utilizando DCFDA, (C) y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) usando TMRE. (B, D) Promedios obtenidos de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE.

5.3 El antioxidante N-acetilcisteína inhibe el estrés oxidativo inducido por el I-CRP en MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo.

Para evaluar si la muerte celular inducida por el I-CRP es debida a la generación de especies reactivas de oxígeno, se decidió, primeramente, evaluar la capacidad antioxidante de NAC (N-acetilcisteína), un precursor del glutatión. Dejando solas o pre-tratando las células con NAC, se evaluó la producción de ROS ante la CC₅₀ del I-CRP durante 24 hrs, utilizando el marcaje DCFDA. Los resultados mostraron la efectividad del antioxidante, en ambas líneas tumorales, al inhibir significativamente la generación de especies reactivas (**Fig. 12**). Pre-tratar MCF-7 con NAC, disminuye significativamente la producción de ROS por el I-CRP (ICRP 37.56±3.5% & ICRP+NAC 13.22±1.8%, $P<0.0001$), sin embargo, no logra inhibir por completo la producción de ROS, ya que el grupo I-CRP+NAC fue significativamente diferente al grupo CTR (1.7±1.1%) y al grupo CTR+NAC (4.17±1.58%), $P<0.0001$ (**Fig. 12 A, B**). Por el contrario, en las células MDA-MB-231 “triple negativo”, el NAC inhibió por completo la producción de ROS inducida por el I-CRP; ya que: CTR, CTR+NAC e I-CRP+NAC no presentaron diferencias significativas. En MDA-MB-231 el antioxidante redució las células DCFDA⁺ en el grupo I-CRP (37.56±3.5%) un 71.7% al pre-tratarlas con NAC (13.22±1.8%), $P<0.0001$ (**Fig. 12 C, D**).

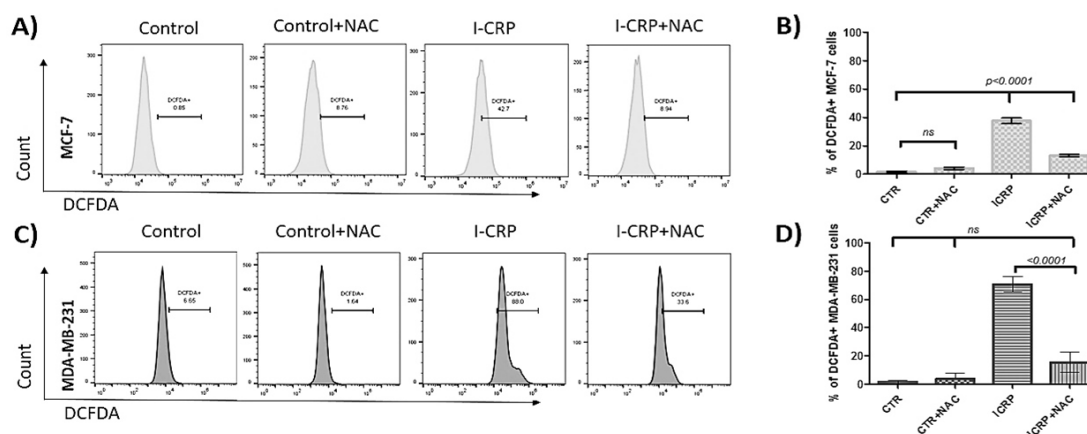


Figura 12. La N-acetilcisteína inhibe la generación de ROS dada por el I-CRP. (A, C) Las células se dejaron solas o se pre-trataron con NAC y posteriormente se trataron con 1.41 UI/mL (MCF-7 en gris) ó 1.32 UI/mL (MDA-MB-231 en negro) durante 24 hrs, posteriormente la cantidad de ROS fue medida mediante citometría de flujo utilizando DCFDA. (B, D) Promedios de tres experimentos independientes realizados por triplicado ±DE.

5.4 La muerte celular causada por el I-CRP en células MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo” depende de la generación de ROS.

Posteriormente, utilizando el marcaje Ann/PI mediante citometría de flujo, se procedió a evaluar la muerte celular inducida por ROS en MCF-7 y MDA-MB-231, para lo cual las células fueron dejadas solas o pre-tratadas con NAC, y posteriormente tratadas con la CC₅₀ de I-CRP durante 24 hrs. Los resultados muestran, que la inhibición de ROS disminuye significativamente la muerte celular causada por el I-CRP, sin embargo, en MCF-7 no la inhibe totalmente (**Fig. 13 A**). En MCF-7 el NAC logra disminuir significativa la muerte inducida por el I-CRP (I-CRP 40.11±4% & ICRP+NAC 23.72±1.8%, $P<0.0001$), sin embargo, el grupo I-CRP+NAC (23.72±1.8%) presenta diferencias significativas con respecto al control (CTR 3.38±0.9, $P<0.0001$). Es importante, recordar que, la concentración de NAC empleada no logra reducir la producción total de ROS en MCF-7 (**Fig. 12 B**). En MDA-MB-231, el grupo CONTROL (9.28±0.1), CTR+NAC (13.27±6) e I-CRP+NAC (25.44±2.13), no presentan diferencias significativas entre sí, concluyendo que la muerte inducida por el ICRP (53.91±1.6) depende totalmente de la producción de ROS (I-CRP+NAC 25.44±2.1, $P<0.05$) (**Fig. 13 B**).

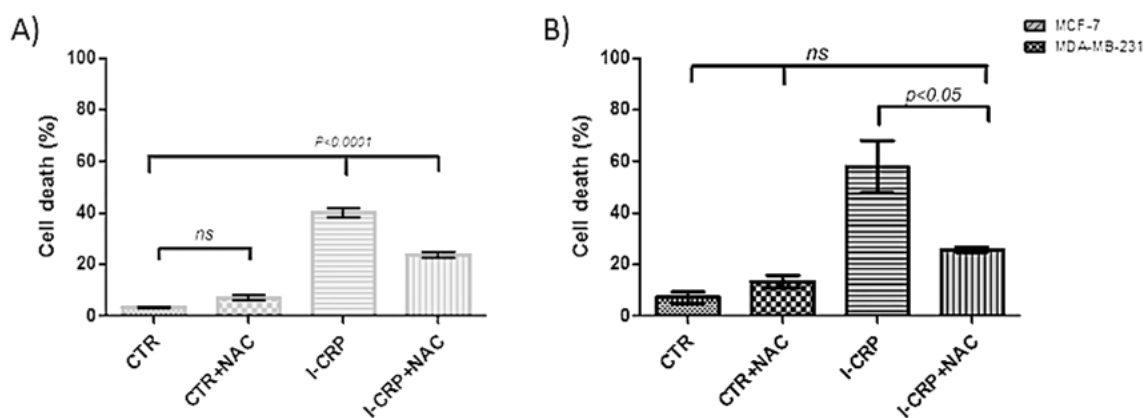


Figura 13. La N-acetilcisteína inhibe la muerte celular inducida por el I-CRP. (A, B) Las células se dejaron solas o se pre-trataron con NAC y posteriormente se trataron con 1.41 UI/mL (MCF-7 en gris) o 1.32 UI/mL (MDA-MB-231 en negro) durante 24 hrs, posteriormente la muerte celular fue medida utilizando el marcaje Ann/PI. Promedios de tres experimentos independientes realizados por triplicado ±DE.

5.5 La epirubicina posee un efecto antitumoral, per se, sobre MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.

Posterior a estudiar la muerte celular inducida por el I-CRP en células tumorales de cáncer de mama, se procedió a analizar las concentraciones inhibitorias y citotóxicas de las quimioterapias más frecuentemente utilizadas en esta patología, epirubicina y ciclofosfamida. Los resultados muestran que concentraciones micromolares crecientes de epirubicina reducen de manera dependiente de dosis el metabolismo celular en MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo” (**Fig. 14 A**), obteniendo una IC_{50} de 76.70 μM y 74.74 μM ($P < 0.0001$), respectivamente. Tales concentraciones se relacionan directamente, con un incremento en la muerte celular, obteniendo una CC_{50} de 150 μM en células MCF-7, y una CC_{50} de 200 μM en MDA-MB-231 ($P < 0.0001$) (**Fig. 14 B**). Concluyendo que la epirubicina induce un mayor efecto citotóxico sobre MCF-7 en comparación con su contraparte “triple negativo” MDA-MB-231 frente a la CC_{50} . La citotoxicidad a partir de la CC_{50} no presenta diferencias entre ambas líneas tumorales; sin embargo, la epirubicina induce una mayor inhibición en células MDA-MB-231, sugiriendo un efecto citostático adicional en éstas.

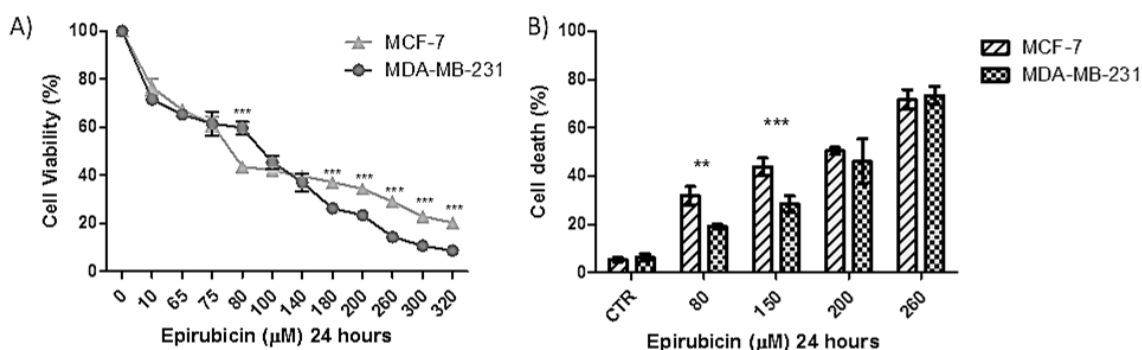


Figura 14. La epirubicina reduce la viabilidad e incrementa la muerte celular de MCF-7 y MDA-MB-231 de manera dependiente de dosis. MCF-7 (gris) y MDA-MB-231 (negro) fueron tratadas con concentraciones micromolares crecientes de epirubicina durante 24 hrs. (A) Viabilidad celular relativa determinada mediante Alamar blue (resazurina) y expresada mediante porcentaje, considerando la fluorescencia emitida por el control como el 100%. (B) La muerte celular fue analizada mediante citometría de flujo utilizando el marcaje Ann/PI. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, y *** $P < 0.0001$.

5.6 La ciclofosfamida posee un efecto antitumoral, per se, sobre MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.

Utilizando la misma metodología, se inició el estudio de concentraciones milimolares crecientes de ciclofosfamida, encontrando que, la ciclofosfamida reduce la actividad metabólica de ambas líneas tumorales de manera dependiente de dosis, sin mostrar diferencias entre la IC₅₀ de MCF-7 (IC₅₀: 22.89 mM) y MDA-MB-231 (IC₅₀: 23.08 mM) (**Fig. 15 A**). Se observó que la disminución en la actividad metabólica se asociaba con un incremento en la muerte celular, sin embargo, las células mostraron una marcada diferencia a la citotoxicidad de la quimioterapia, presentando MCF-7 mayor muerte ante ésta en comparación con MDA-MB-231 (CC₅₀: 24 mM & CC₅₀: 33 mM, respectivamente) (**Fig. 15 B**). Con estos resultados se concluye que MCF-7 es más sensible a la inhibición (a partir de la IC₅₀) y a la muerte celular (en todos los niveles de las CC) en comparación con MDA-MB231 ante la ciclofosfamida.

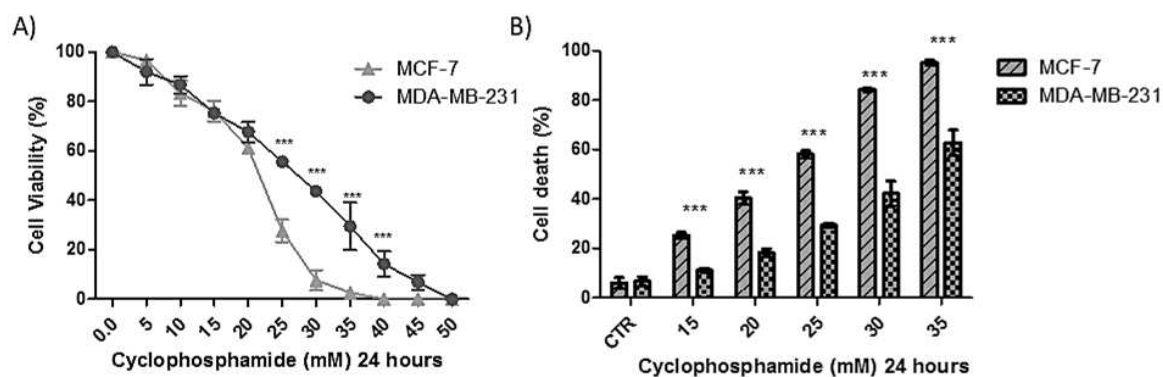


Figura 15. La ciclofosfamida reduce la viabilidad e incrementa la muerte celular de MCF-7 y MDA-MB-231 de manera dependiente de dosis. MCF-7 (gris) y MDA-MB-231 (negro) fueron tratadas con concentraciones milimolares crecientes de ciclofosfamida durante 24 hrs. **(A)** Viabilidad celular relativa determinada mediante Alamar blue (resazurina) y expresada mediante porcentaje, considerando la fluorescencia emitida por el control como el 100%. **(B)** La muerte celular fue analizada mediante citometría de flujo utilizando el marcaje Ann/PI. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, y *** $P < 0.0001$.

5.7 Las respuestas dependientes de dosis de las células MCF-7 y MDA-MB-231 a los tratamientos siguen curvas no-rectas, debido a su comportamiento biológico.

Unificando en un modelo matemático las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbach, y Scatchard, se crea la ecuación del efecto-medio, la cual mantiene un equilibrio estacionario de las condiciones biológicas de un organismo y refleja de manera realista el comportamiento fisicoquímico de la célula ante una droga. Utilizando las curvas dosis-efecto, graficamos, por lo tanto, el comportamiento biológico de 3 maneras: hiperbólica, sigmoidea y plana-sigmoidea, adoptando la forma según la pendiente (m) de la ecuación. Utilizando el software Compusyn®, se obtuvo la respuesta farmacodinámica de los tratamientos al ingresar los resultados previos (actividad metabólica), y se observó que el efecto dependiente de dosis dados por el I-CRP, la ciclofosfamida y la epirubicina, seguían curvas sigmoideas, sigmoideas y planas-sigmoideas, respectivamente, tanto en MCF-7 (**Fig. 16**) como en MDA-MB-231 (**Fig. 17**), las cuales muestran el rango de concentraciones inhibitorias y la cercanía entre cada una de ellas.

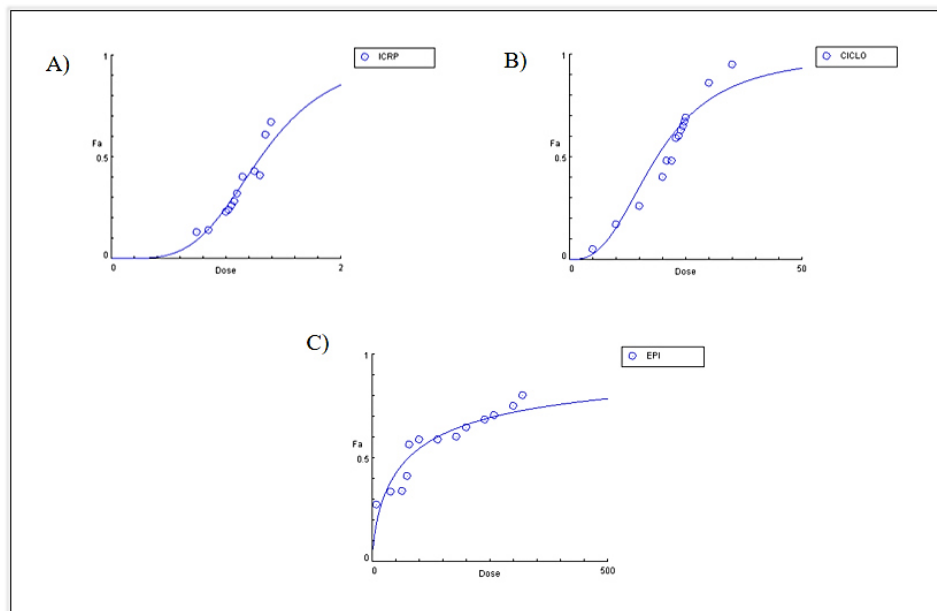


Figura 16. Comportamiento fisicoquímico de MCF-7 frente a I-CRP, ciclofosfamida y epirubicina. La inhibición dada por los tratamientos fue ingresada al software Compusyn® donde el comportamiento fisicoquímico se arrojó mediante curvas dosis-efecto. (A) Curva sigmoidea de I-CRP, $m=4.11$, $Dm=1.30\text{UI/mL}$, $r=0.95$. (B) Curva sigmoidea de ciclofosfamida, $m=2.67$, $Dm=18.74\text{mM}$, $r=0.93$. (C) Curva sigmoidea-plana de epirubicina, $m=0.69\pm 0.08$, $Dm=76.70\mu\text{M}$, $r=0.92$.

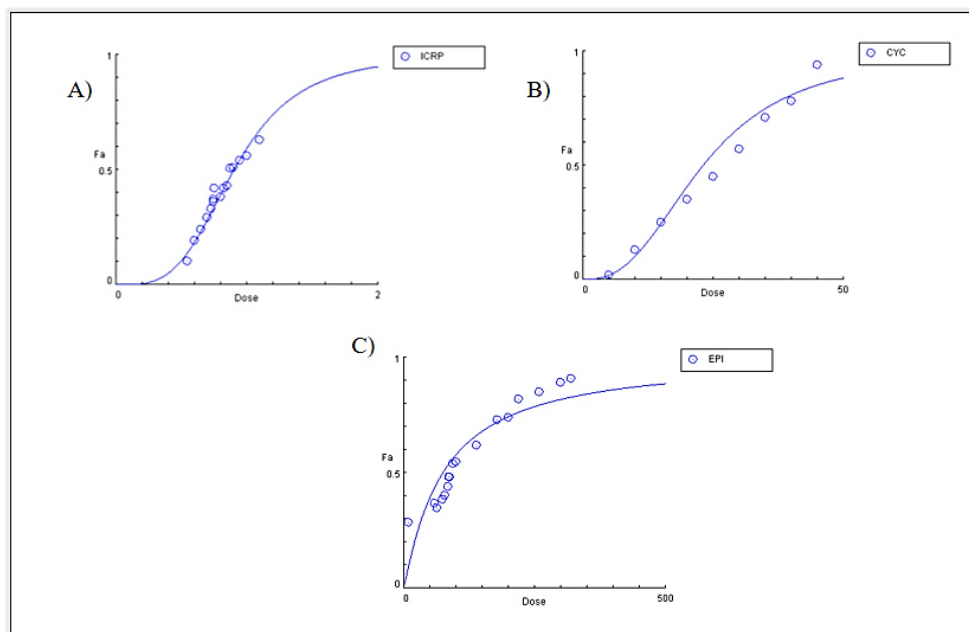


Figura 17. Comportamiento fisicoquímico de MDA-MB-231 frente a I-CRP, ciclofosfamida y epirubicina. La inhibición dada por los tratamientos fue ingresada al software Compusyn® donde el comportamiento fisicoquímico se arrojó mediante curvas dosis-efecto. **(A)** Curva sigmoidea de I-CRP, $m=3.66\pm0.20$, $Dm=0.90\text{UI/mL}$, $r=0.98$. **(B)** Curva sigmoidea de ciclofosfamida, $m=2.60\pm0.23$, $Dm=23.08\text{ mM}$, $r=0.973$. **(C)** Curva sigmoidea-plana de epirubicina, $m=1.08\pm0.15$, $Dm=74.74\mu\text{M}$, $r=0.87$.

Conocer la forma real de la curva dosis-efecto en todos los niveles de efecto (IC_1 al IC_{100}) corrigió las concentraciones inhibitorias previas, lo que permitió emplearlas en las combinaciones. Los resultados finales se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Complicación de Concentraciones Inhibitorias de I-CRP, ciclofosfamida y epirubicina en MCF-7 y MDA-MB-231.

	<i>I-CRP</i> (UI/mL)		<i>CICLOFOSFAMIDA</i> (mM)		<i>EPIRUBICINA</i> (μ M)	
	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-7	MDA-MB-231
<i>IC₁</i>	0.42	0.25	3.37	3.96	0.101	1.06
<i>IC₁₀</i>	0.76	0.49	8.25	9.94	3.22	9.80
<i>IC₁₅</i>	0.85	0.56	9.81	11.87	6.28	15.03
<i>IC₂₀</i>	0.92	0.61	11.17	13.56	10.38	20.74
<i>IC₂₅</i>	0.99	0.66	12.44	15.14	15.72	27.06
<i>IC₃₀</i>	1.05	0.71	13.66	16.68	22.59	34.14
<i>IC₃₅</i>	1.12	0.76	14.88	18.20	31.40	42.17
<i>IC₄₀</i>	1.18	0.80	16.11	19.75	42.73	51.37
<i>IC₅₀</i>	1.3**	0.90**	18.74*	23.08*	76.7	74.74
<i>IC₆₀</i>	1.43	1.00	21.81	26.96	137.68	108.74
<i>IC₇₀</i>	1.6	1.13	25.72	31.93	260.45	163.2
<i>IC₉₉</i>	3.91	3.17	104.14	134.30	58080.7	5233.42

Las diferencias significativas en las *IC*₅₀, entre ambas líneas celulares, se marcan con asteriscos (**p*<0.05, ***p*<0.001).

5.8 Análisis de la combinación del I-CRP con epirubicina en líneas tumorales de cáncer de mama.

5.8.1 Concentraciones mínimas I-CRP incrementan sinérgicamente el efecto antitumoral de la epirubicina en MCF-7.

La epirubicina se encuentra entre los fármacos anticancerígenos más efectivos jamás desarrollados, con un amplio espectro de indicaciones, sin embargo, su utilidad clínica se ve obstaculizada por sus efectos secundarios, por lo que es de particular interés, reducir las dosis administradas. En este trabajo, se encontró que la adición de concentraciones mínimas de I-CRP (IC_1), incrementaban el efecto antitumoral de la epirubicina observado anteriormente mediante el método de Alamar Blue (resazurina) (**Fig. 14 A**). La combinación de I-CRP (IC_1) con epirubicina a las concentraciones de: 22.59 μM (IC_{30}), 42.73 μM (IC_{40}), 76.70 μM (IC_{50}) ó 137.68 μM (IC_{60}), resultaban en una inhibición significativamente mayor comparada a la dada por la quimioterapia sola (**Tabla 9**). Las combinaciones $IC_1:IC_{30}$ e $IC_1:IC_{40}$, tuvieron un efecto sinérgico al obtener un CI de 0.64. Y, las combinaciones $IC_1:IC_{50}$ e $IC_1:IC_{60}$, ejercieron un efecto sinérgico moderado, CI de 0.83 CI 0.86 respectivamente, como se muestra en el isoblograma normalizado (**Fig. 18 B**).

El índice de reducción de dosis (DRI, por sus siglas en inglés), denota cuántas veces reducir la dosis de cada droga es permitido debido al sinergismo, logrando un mayor efecto terapéutico. Los resultados muestran que la sinergia de combinar 0.42 UI/mL de I-CRP y 22.59 μM de epirubicina ($IC_1:IC_{30}$), permiten lograr lo que por separado 1.28 UI/mL de I-CRP o 71.57 μM de epirubicina lograrían: un efecto inhibitorio del 48.82%; en este caso, la combinación obtiene una reducción de 3.21 veces de I-CRP, y 4.32 veces de epirubicina. La reducción de dosis de I-CRP en los radios $IC_1:IC_{40}$, $IC_1:IC_{50}$ e $IC_1:IC_{60}$, es de 2.7, 3.52 y 4.35 veces, respectivamente; y, de epirubicina, de 2.49, 2.06 y 1.56 veces, respectivamente.

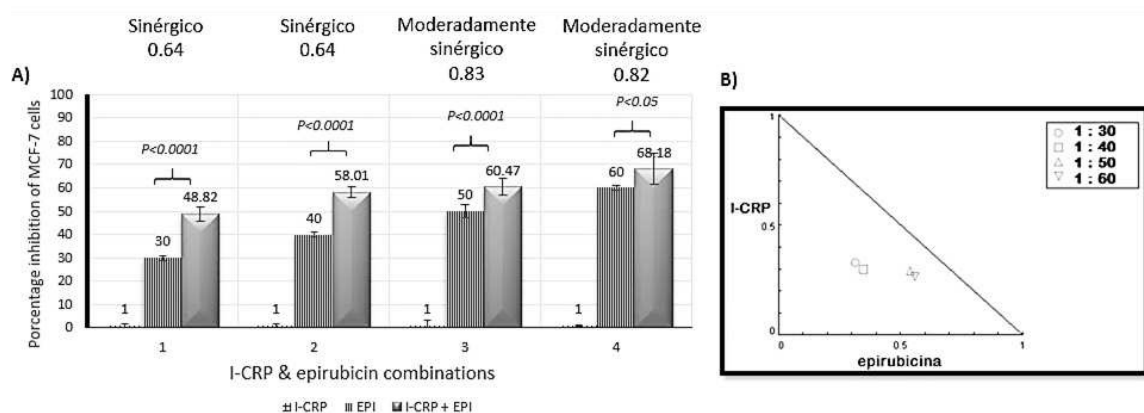


Figura 18. Efecto sinérgico del I-CRP sobre células MCF-7 tratadas con epirubicina. (A) Las células fueron tratadas con I-CRP y epirubicina durante 24 hrs, y la viabilidad celular fue valorada mediante el método de Alamar Blue (resazurina). (B) Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), expresada gráficamente mediante el isoblograma normalizado, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado \pm DE.

5.8.2 Concentraciones mínimas de I-CRP incrementan sinérgicamente el efecto antitumoral de la epirubicina en MDA-MB-231 “triple negativo”.

Utilizando la misma metodología, se estudió el efecto de la adición de I-CRP (IC_1) en células MDA-MB-231 “triple negativo” tratadas con epirubicina. Se encontró que mínimas concentraciones de I-CRP (IC_1) incrementaban el efecto inhibitorio de la epirubicina sobre esta línea tumoral de mal pronóstico (**Fig. 19**). Las combinaciones IC_1 -ICRP: IC_{20} EPI, IC_1 -ICRP: IC_{30} EPI e IC_1 ICRP: IC_{40} EPI; obtuvieron un incremento significativo en la disminución de la actividad metabólica, en comparación con la quimioterapia sola, obteniendo un porcentaje inhibitorio de $51.93\% \pm 2$, $55.22\% \pm 3.9$ y $64.71\% \pm 4.1$, respectivamente (**Tabla 10**).

El índice combinacional obtenido de tales combinaciones fue de 0.52, 0.63 y 0.61, respectivamente (**Fig 19 B**), considerados como sinérgicos, lo que permitió deducir el *DRI*. Mediante el software Compusyn, se calculó que la combinación IC₁:IC₂₀, logra reducir la quimioterapia 4.36 veces (de 80.19 μ M a 20.74 μ M), y al I-CRP 3.7 veces. La combinación IC₁:IC₃₀ reduce la quimioterapia 2.65 veces (de 90.66 μ M a 34.14 μ M), y al I-CRP 3.83 veces. Y finalmente, la combinación IC₁:IC₄₀, la reduce 2.65 veces (de 130.88 μ M a 50.37 μ M), disminuyendo también el I-CRP de 1.06 a 0.25 UI/mL.

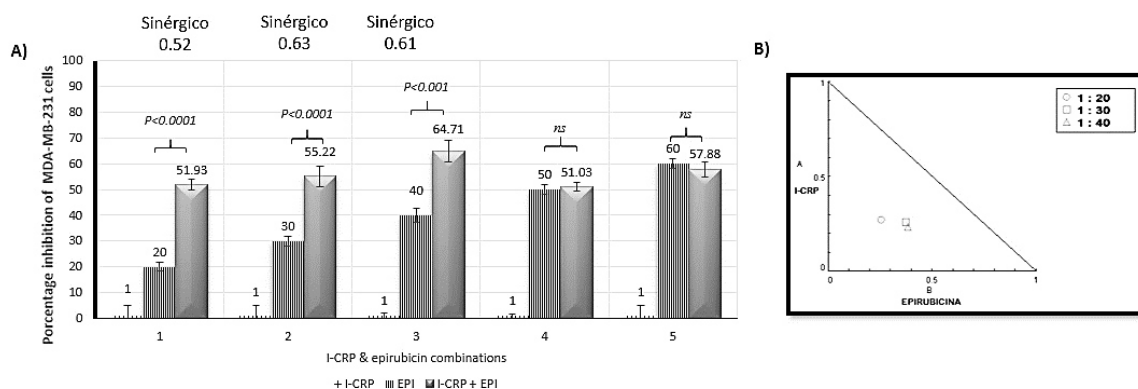


Figura 19. Efecto sinérgico del I-CRP sobre células MDA-MB-231 tratadas con epirubicina. (A) Las células fueron tratadas con I-CRP y epirubicina durante 24 hrs, y la viabilidad celular fue valorada mediante el método de Alamar Blue (resazurina). (B) Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), expresada gráficamente mediante el isoblograma normalizado, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado \pm DE.

5.8.3 Concentraciones mínimas de I-CRP incrementan significativamente la muerte celular inducida por la epirubicina en MCF-7 y MDA-MB-231 “triple negativo”.

Para evaluar la muerte celular inducida por el tratamiento combinado se utilizó el marcaje con anexina V, para medir la exposición de fosfatidilserina, y el marcaje con yoduro de propidio, para valorar la permeabilidad de la membrana plasmática. Los resultados muestran que la muerte celular inducida por la epirubicina se incrementa significativamente con la adición de I-CRP (CC₁), en ambas líneas tumorales (**Fig. 20**). El efecto sinérgico encontrado previamente sobre la inhibición celular, en ambas líneas celulares, se correlaciona, por lo tanto, a un incremento en la citotoxicidad por la quimioterapia, y, por ende, a una disminución en el número de células, como se aprecia en las micrografías de luz (**Fig. 21**).

En MCF-7 las combinaciones CC₁:CC₃₀ e CC₁:CC₅₀, inducen una muerte de 48.85%±11.59 (**Fig. 20 A, B**) y 62.25%±2.97 (**Fig. 20 C, D**), respectivamente; un porcentaje significativamente mayor de muerte celular comparada con la quimioterapia sola.

En MDA-MB-231, las mismas combinaciones CC₁:CC₃₀ e CC₁:CC₅₀, indujeron una muerte de 49.4%±0.42 (**Fig. 20 E, F**) y 70.86%±4.42 (**Fig. 20 G, H**), respectivamente; también un porcentaje significativamente mayor de muerte celular comparada con la quimioterapia sola.

Las muertes celulares inducidas por las combinaciones, en las mismas concentraciones citotóxicas entre ambas líneas tumorales, no presentan diferencias significativas, sugiriendo que el I-CRP (IC₁), normaliza la respuesta citotóxica de la quimioterapia, independiente de las diferencias moleculares presentes en los subtipos moleculares.

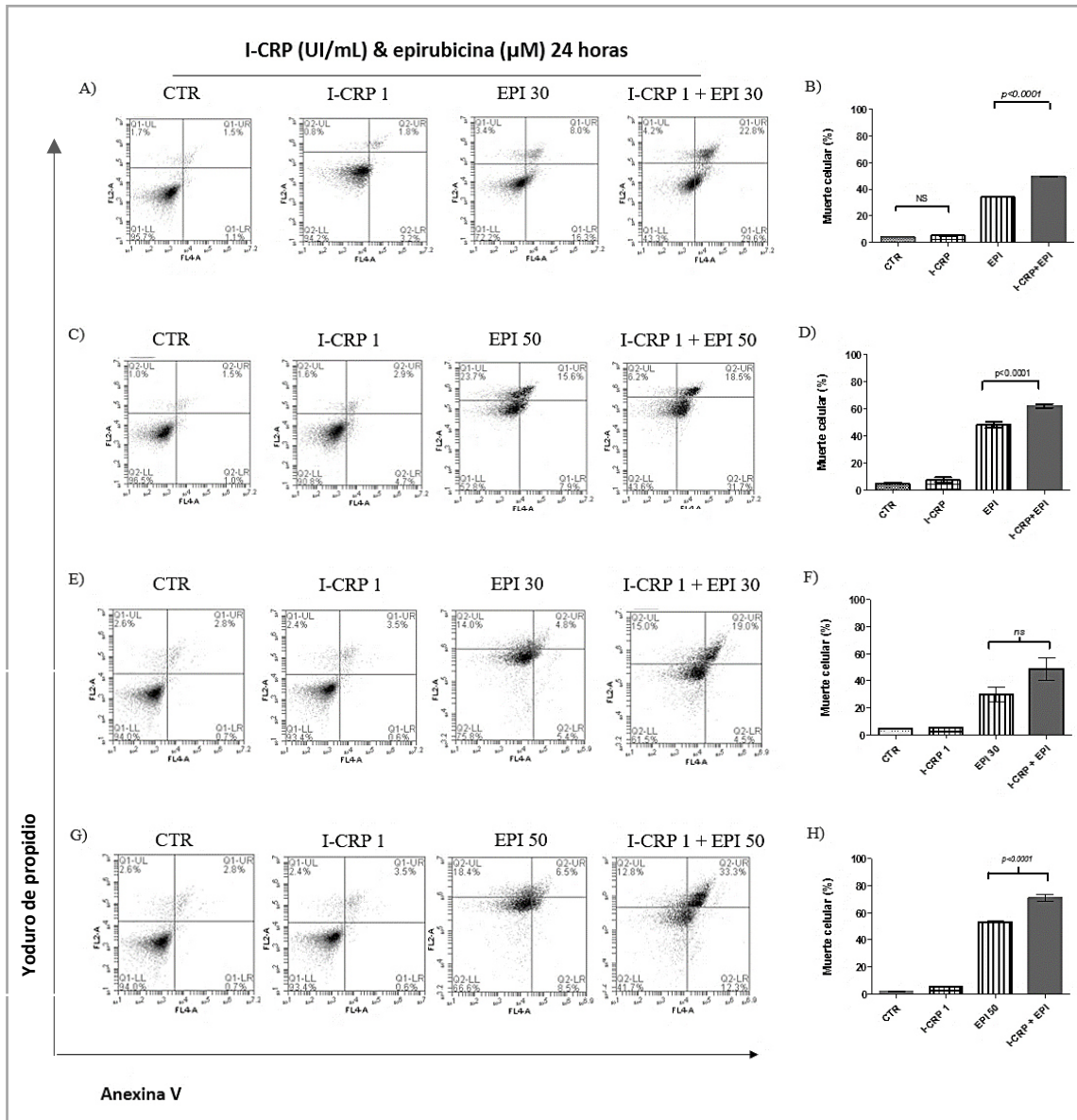


Figura 20. El I-CRP incrementa la muerte celular inducida por la epirubicina. (A, C) Células MCF-7 y (E, G) MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (B, D, F, H) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. MCF-7: ICRP $CC_1 = 0.56$ UI/mL. Epirubicin $CC_{30} = 100$ μ M and $CC_{50} = 170$ μ M. MDA-MB-231: ICRP $CC_1 = 0.51$ UI/mL. Epirubicin $CC_{30} = 150$ μ M and $CC_{50} = 200$ μ M.

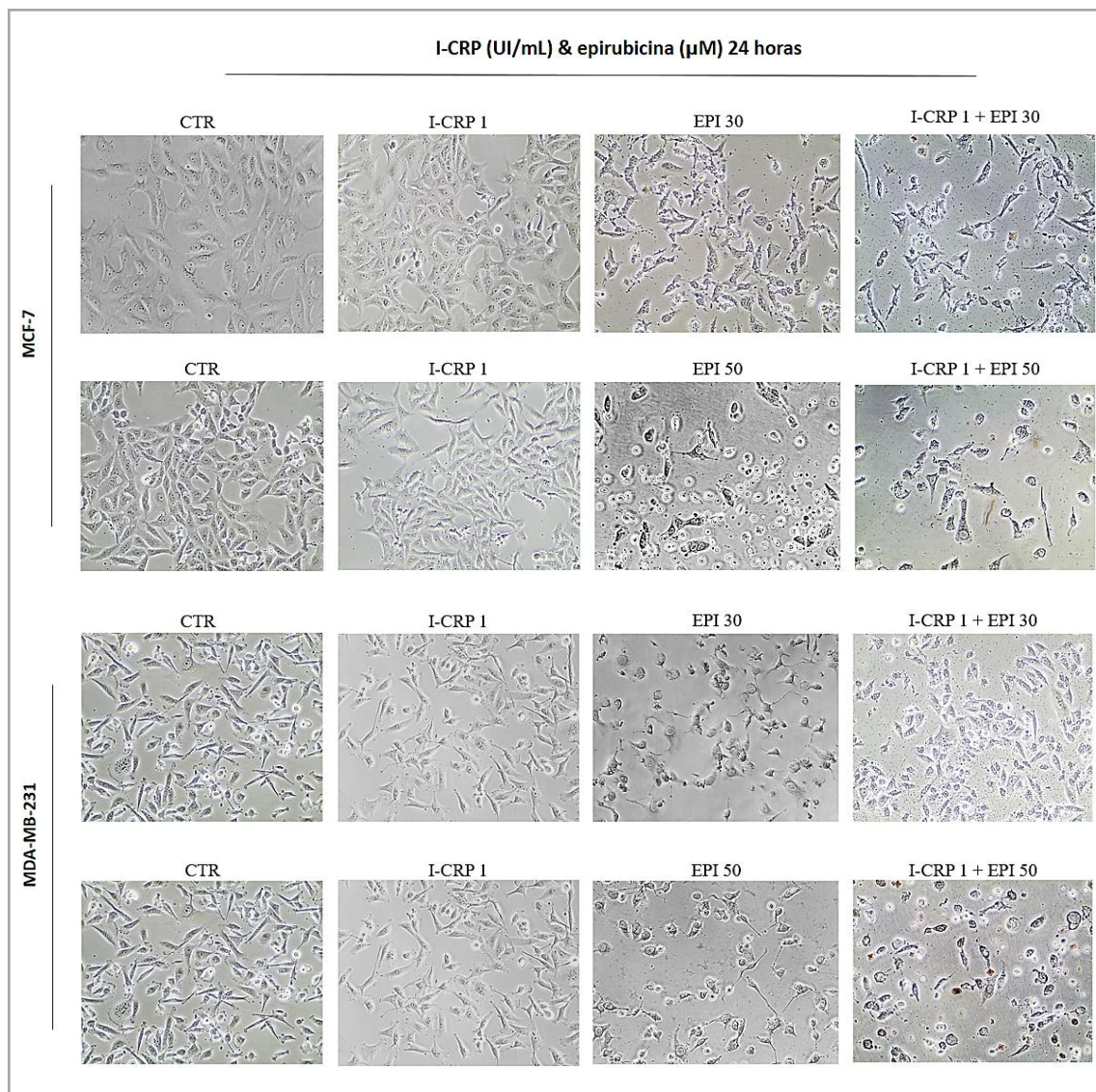


Figura 21. El I-CRP induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la epirubicina. Células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

5.9 Análisis de la combinación de la epirubicina con el Immunepotent-CRP.

5.9.1 Concentraciones mínimas de epirubicina incrementan aditivamente el efecto antitumoral del I-CRP en MCF-7.

Continuando con la metodología con Alamar blue, se estudio el efecto de concentraciones mínimas de epirubicina (IC_1) en combinación con dosis mayores de I-CRP: IC_{15} , IC_{30} , IC_{50} o IC_{60} , en MCF-7; tales combinaciones obtuvieron una inhibición celular de $16.87 \pm 2\%$, $31.75 \pm 5.84\%$, $51.66 \pm 2.69\%$ y $61.81 \pm 0.20\%$, respectivamente (**Tabla 9**). Éstas, al compararlas con el efecto inhibitorio dado por el I-CRP sólo, no presentaban diferencias significativas (**Fig. 22**); por lo que la epirubicina, a dosis bajas, no disminuye ni potencia el efecto antitumoral inhibitorio del I-CRP. Al ingresar los resultados previos al software CompuSyn®, las combinaciones obtuvieron un CI de 0.97, 0.98, 0.98 y 0.97, respectivamente, descritas como aditivas.

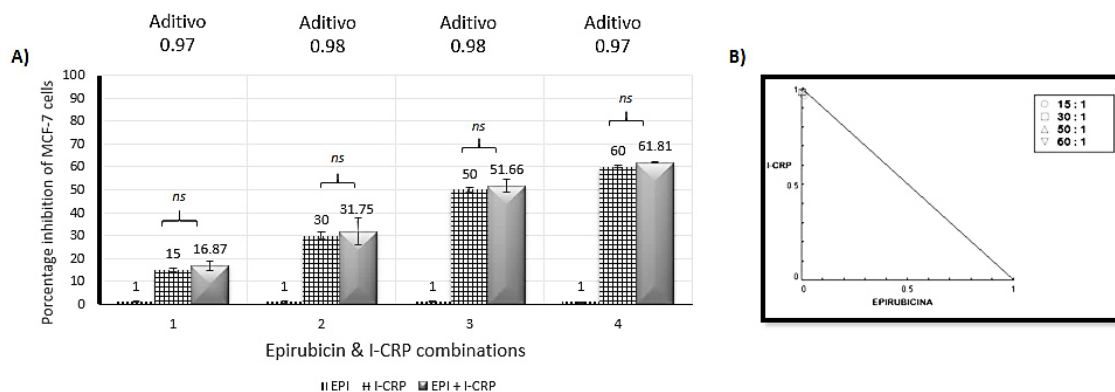


Figura 22. Efecto aditivo de la epirubicina sobre células MCF-7 tratadas con I-CRP (A) Las células fueron tratadas tanto con el I-CRP como con epirubicina (IC_1) durante 24 hrs, posteriormente la viabilidad celular se midió mediante el método de Alamar blue. **(B)** Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), expresada gráficamente mediante el isoblograma normalizado, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado \pm DE.

5.9.2 Concentraciones mínimas de epirubicina incrementan sinérgicamente el efecto antitumoral del I-CRP en MDA-MB-231 “triple negativo”.

Posteriormente, se evaluó la respuesta de la adición de concentraciones mínimas de epirubicina (IC_1) a las células MDA-MB-231 “triple negativo” tratadas con la IC_{20} , IC_{30} , IC_{50} ó IC_{60} de I-CRP (**Tabla 10**). Los resultados mostraron que tales combinaciones incrementaban generalmente de manera sinérgica la actividad antitumoral inhibitoria del I-CRP (**Fig. 23 A**); siendo aditiva, únicamente, en la combinación $IC_1:IC_{50}$ (**Fig. 22 B**).

Gracias al sinergismo dado por la epirubicina (IC_1) al tratamiento con I-CRP de células “triple negativo”, se logra reducir y economizar I-CRP 1.58 veces (de 0.98 UI/mL a 1.06 UI/mL), en un radio de 1:20; disminuyendo también la quimioterapia 91.85 veces. Utilizarla en un radio de 1:30, reduce el I-CRP 1.51 veces, de 1.07 UI/mL a 0.71 UI/mL, disminuyendo la quimioterapia 126.52 veces. Y finalmente, su empleo en un radio 1:60, disminuye 1.32 veces la cantidad de I-CRP requerida (de 1.34 UI/mL a 1.01 UI/mL); disminuyendo 264.71 veces el uso de quimioterapia.

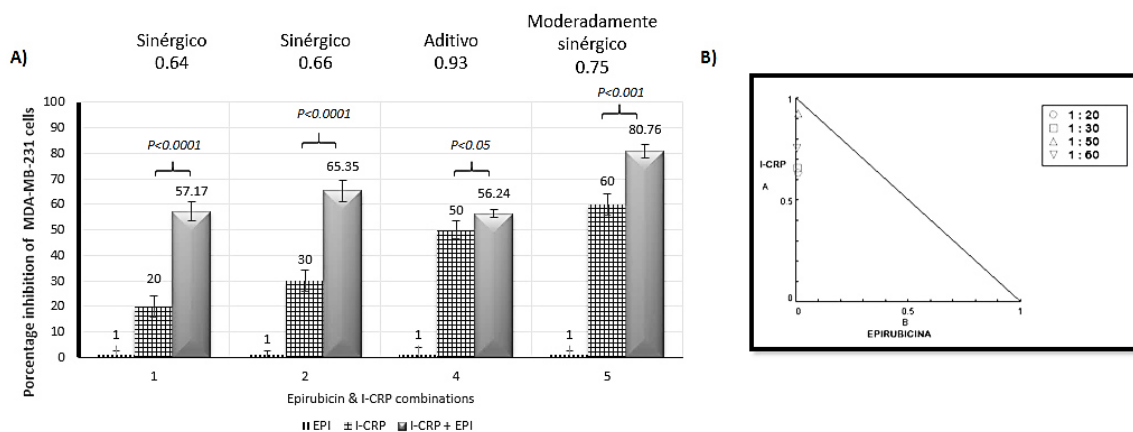


Figura 23. Efecto sinérgico de la epirubicina sobre células MDA-MB-231 tratadas con I-CRP (A) Las células fueron tratadas tanto con el I-CRP como con epirubicina (IC_1) durante 24 hrs, posteriormente la viabilidad celular se midió mediante el método de Alamar blue. **(B)** Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), expresada gráficamente mediante el isoblograma normalizado, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado \pm DE.

5.9.3 Concentraciones mínimas de epirubicina incrementan la muerte celular inducida por el I-CRP de manera variable en MCF-7 y MDA-MB-231.

De nuevo, utilizando el marcaje con anexina V para medir la exposición de fosfatidilserina, y yoduro de propidio (IP) para valorar la permeabilidad de la membrana plasmática, se procedió a evaluar la citotoxicidad o muerte celular inducida por tal combinación. Los resultados muestran que la muerte celular inducida por el I-CRP se incrementa con la adición de epirubicina (CC_1), en la línea tumoral MCF-7 (**Fig. 24 A, C**), sin embargo, este incremento no siempre es significativo. La combinación $CC_{30}:CC_1$, induce una muerte de $56.22\% \pm 1.76$ (**Fig. 24 B**), un porcentaje significativamente mayor al de la muerte celular dada por el I-CRP sólo. Por otro lado, la combinación $CC_{50}:CC_1$, genera una muerte del $62.25\% \pm 2.97$ (**Fig. 24 D**), la cual al compararse con la del I-CRP, no fue significativa. El efecto aditivo encontrado previamente sobre la inhibición celular se correlaciona, por lo tanto, a un incremento en la citotoxicidad, cuando las concentraciones del I-CRP son menores a la IC_{50} . Con lo anterior, se concluye, que la adición de epirubicina (CC_1) no pone en detrimento el efecto antitumoral del I-CRP, por el contrario, incrementa su citotoxicidad en algunas combinaciones, las cuales deben de ser estudiadas previamente.

En MDA-MB-231 “triple negativo”, las combinaciones $CC_{10}:CC_1$ e $CC_{40}:CC_1$, indujeron una muerte de $22.73\% \pm 4.35$ (**Fig. 24 F**) y $62.63\% \pm 3.16$ (**Fig. 24 H**), respectivamente. Estos resultados mostraron un incremento significativo en la muerte celular, en comparación con la del I-CRP sólo ($P < 0.05$) (**Fig. 24 F, H**). Concluyendo que, el incremento sinérgico de este radio, en la inhibición celular observada mediante el ensayo de rezasurina, es debido a una disminución en el número de células por el incremento en la muerte celular, tal como se muestra en las microscopías de luz (**Fig. 25**).

A diferencia de lo observado en el radio inverso en el apartado 5.8.3 al utilizar la CC_1 del I-CRP, aquí, el empleo de la CC_1 de epirubicina no logra homogenizar el efecto citotóxico del I-CRP, siendo las diferencias moleculares entre MCF-7 y MDA-MB-231, un impedimento para desarrollar su mecanismo de acción.

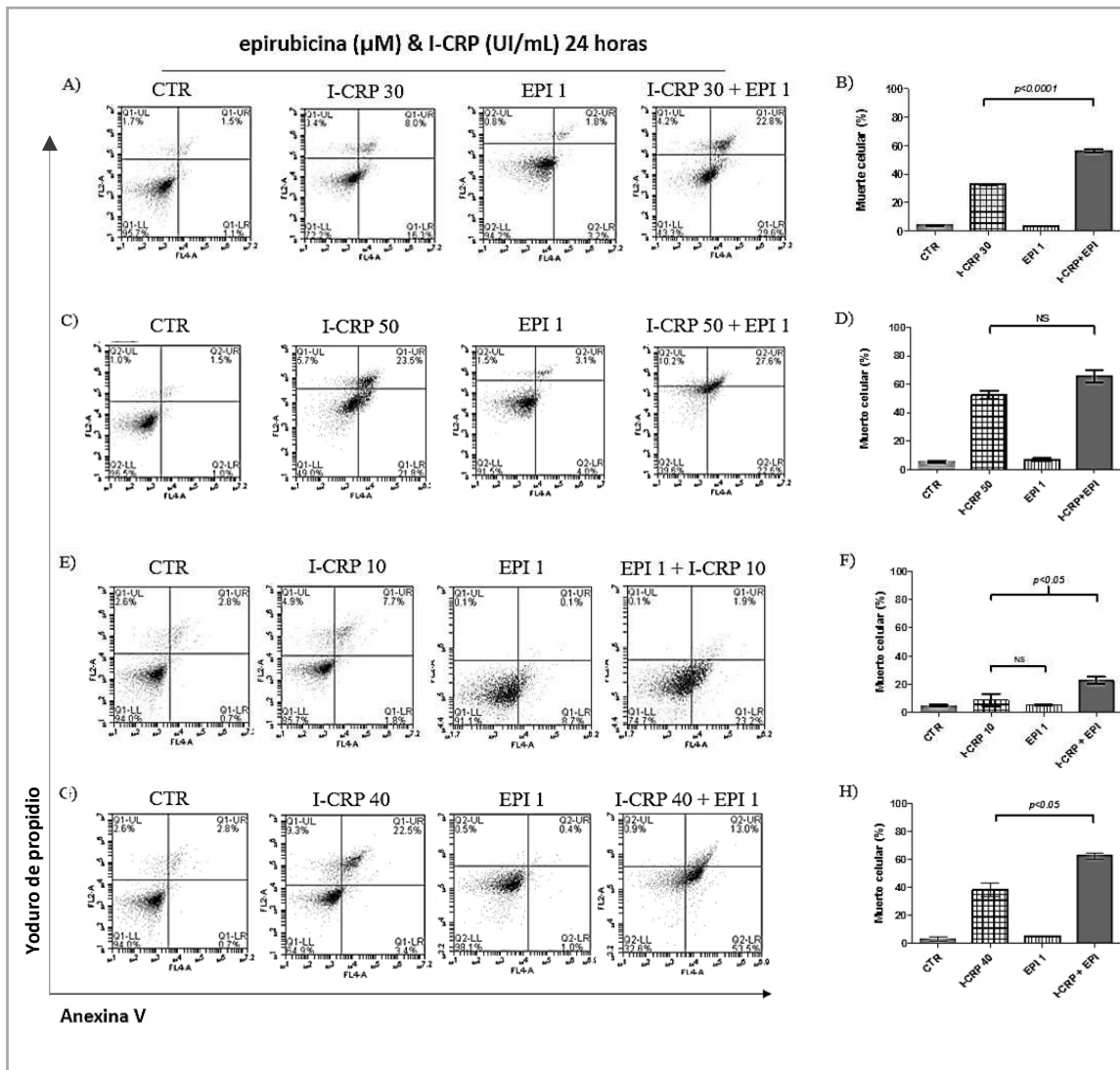


Figura 24. La epirubicina incrementa la muerte celular inducida por el I-CRP. (A, C) Células MCF-7 y (E, G) MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (B, D, F, H) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. MCF-7: ICRP CC_{30} = 1.21 UI/mL and CC_{50} = 1.41 UI/mL. Epirubicina CC_1 = 5 μM . MDA-MB-231: ICRP CC_{10} = 0.61 UI/mL and CC_{40} = 0.80 UI/mL. Epirubicina CC_1 = 10 μM .

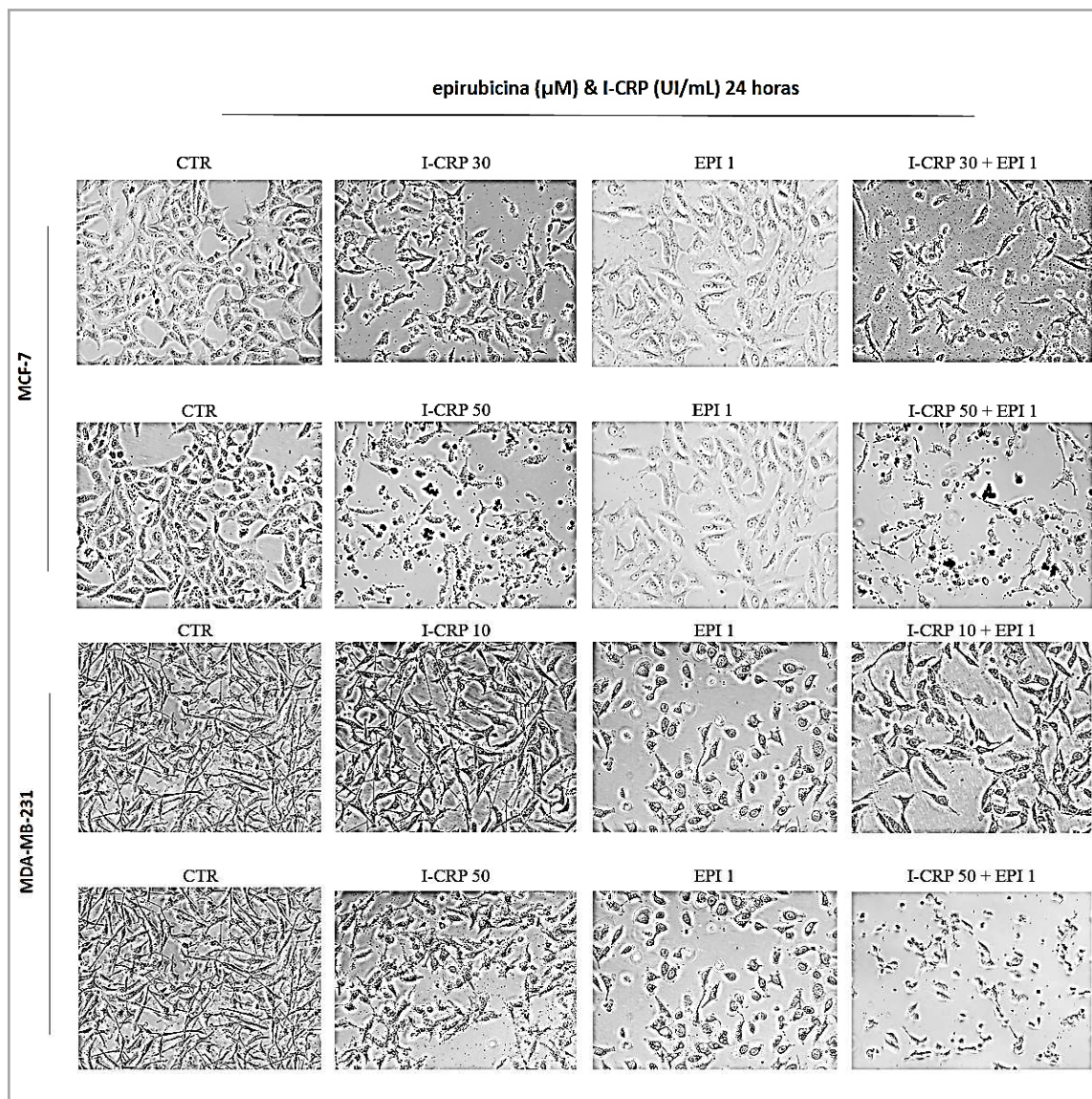


Figura 25. La epirubicina induce cambios en la morfología de muerte celular dada por el I-CRP. Células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas. MCF-7: MDA-MB-231: ICRP CC_{10} = 0.61 UI/mL and CC_{40} = 0.80 UI/mL. Epirubicin CC_1 = 10 μM .

5.10 Análisis de la combinación de I-CRP&epirubicina, a concentraciones equipotentes, en MCF-7 y MDA-MB-231.

Finalmente se estudiaron las combinaciones en un radio constante o equipotente, es decir, concentraciones que inducen el mismo porcentaje de muerte en ambas líneas tumorales. Así como también a radios no constantes con concentraciones diferentes a la IC₁.

Se comenzó el estudio utilizando primeramente el método de Alamar Blue en MCF-7. Se observó que las combinaciones con bajas concentraciones de epirubicina (IC₁) y dosis mayores de I-CRP, pasaban de aditivo a sinergista, al incrementar indiferentemente las concentraciones de epirubicina (**Tabla 9**). Lo anterior se demostró administrando la IC₁₀ (0.76 µM) de epirubicina con las concentraciones 10.38 UI/mL (IC₂₀), 42.73 UI/mL (IC₄₀) ó 76.7 UI/mL (IC₅₀) de I-CRP. La inhibición dada por las combinaciones fue significativamente mayor a la dada por los tratamientos por separado (**Tabla 9**), obteniendo un índice combinacional de 0.72 (moderadamente sinergista), 0.52 (sinergista) y 0.42 (sinergista), respectivamente. La combinación IC₂₀:IC₁₀, permite, por lo tanto, una reducción de 1.7 veces la dosis de I-CRP (de 1.21 UI/mL a 0.76 UI/mL); y una reducción de epirubicina de 7.13 veces (de 74.09 µM a 42.73 µM), para lograr el mismo efecto por separado. Las combinaciones IC₄₀:IC₁₀ e IC₅₀:IC₁₀, lograron una reducción considerable de quimioterapia, de 9.39 veces (de 401.46 µM a 42.73 µM) y 16.35 veces (de 1,254.27 µM a 76 µM), respectivamente; además, disminuyeron también la dosis de I-CRP: 2.26 veces (de 1.72 UI/mL a 0.76 UI/mL) y 2.74 veces (de 2.08 UI/mL a 0.76 UI/mL), respectivamente.

Finalmente se experimentó a radios constantes o equipotentes en MCF-7. Se observó que el patrón sinergista se conservaba en estas. Se llevaron a cabo las combinaciones IC₄₀:IC₄₀ e IC₆₀:IC₆₀, obteniendo una inhibición de 87.41±1.51% y 92.62±1.44%, respectivamente, la cual fue significativamente mayor a la dada por los tratamientos por sí solos (**Tabla 9**). Los índices combinacionales calculados, fueron de 0.59 (sinergismo) y 0.64 (sinergismo), respectivamente; lo que permitió reducir importantemente las concentraciones de los tratamientos. La combinación IC₄₀:IC₄₀, redujo 1.76 veces la concentración de I-CRP (de 2.08 UI/mL a 1.18 UI/mL); y 29.35 veces la dosis de epirubicina (de 1,254.27 µM a 42.73

μM), siendo esta la reducción más alta de quimioterapia encontrada. Por otro lado, la combinación $\text{IC}_{60}:\text{IC}_{60}$, redujo 1.68 veces el I-CRP (de 2.08 UI/mL a 1.18 UI/mL); y 21.34 veces la dosis epirubicina (de 2,938.17 μM a 137.68 μM).

Posteriormente, se evaluó la muerte celular de las combinaciones equipotentes, mediante la tinción de las células MCF-7 con el marcaje Ann/PI, utilizando el citometro de flujo. Al aplicar las concentraciones CC_{30} (1.21 UI/mL/100 μM), CC_{40} (1.34 UI/mL/150 μM) y CC_{50} (1.41 UI/mL/170 μM), de ambos medicamentos, en MCF-7, se obtuvo un porcentaje de muerte celular de $58.4 \pm 0.70\%$, $75.4 \pm 4.42\%$ y $82.17 \pm 5.78\%$, respectivamente, porcentajes significativamente mayores a los dados por los tratamientos solos (**Fig. 26 B, D, F**). Estos resultados indican que el I-CRP aumenta sinérgicamente la inhibición dada por la epirubicina, y viceversa, mediante la inducción de muerte celular; disminuyendo de manera importante la dosis de quimioterapia (**Fig. 26 A, C, D**).

Tabla 9. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & epirubicina en células MCF-7, *in vitro*.

Concentración		Concentración inhibitoria		Porcentaje de inhibición de células MCF-7	Valor p
ICRP UI/mL	EPI mM	ICRP	EPI		
0.42	22.59	1	30	$48.82\% \pm 3.14$	$p < 0.001$
0.42	42.73	1	40	58.01 ± 2.36	$p < 0.001$
0.42	76.7	1	50	60.47 ± 3.70	0.001
0.42	137.68	1	60	69.20 ± 6.76	$p < 0.05$
0.85	0.101	15	1	16.87 ± 2.0	ns
1.06	0.101	30	1	31.75 ± 5.84	ns
1.3	0.101	50	1	51.66 ± 2.69	ns
1.43	0.101	60	1	61.81 ± 0.20	ns
0.63	31.4	5	35	67.08 ± 67.08	$p < 0.0001 / p < 0.001$
0.76	10.38	10	20	49.46 ± 3.23	$p < 0.05 / p < 0.05$
0.76	42.73	10	40	75.90 ± 0.34	$p < 0.001 / p < 0.0001$
0.76	76.7	10	50	87.47 ± 0.86	$p < 0.0001 / p < 0.05$
1.18	10.38	40	20	82.37 ± 1.59	$p < 0.001 / p < 0.0001$
1.18	42.73	40	40	87.41 ± 1.51	$p < 0.0001 / p < 0.0001$
1.43	137.68	60	60	92.62 ± 1.44	$p < 0.05 / p < 0.05$

Células MCF-7 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina durante 24 hrs, al termino del cual, la viabilidad celular se analizó mediante Alamar blue y se expresó como porcentaje, considerando la fluorescencia del control como el 100%. Finalmente, la inhibición fue expresada al restar al 100% la viabilidad. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. *P* significativa valorando el resultado de la combinación con el tratamiento individual: I-CRP/ epirubicina.

De la misma manera, se realizó en MDA-MB-231 “triple negativo” combinaciones con concentraciones constantes y no constantes distintas a la IC_1 , empleando la metodología de Alamar Blue. Los resultados muestran que las combinaciones contantes $IC_{15}:IC_{15}$ ($48.72\% \pm 1.04$), $IC_{30}:IC_{30}$ ($71.72\% \pm 2.5$) y $IC_{40}:IC_{40}$ ($67.51\% \pm 1.77$), ejercen un mayor porcentaje de inhibición que los tratamientos por sí solos (**Tabla 10**). El índice combinacional calculado de 0.83, 0.8 y 1.09, respectivamente, lo clasifica como un efecto sinergista moderado (0.833 y 0.8) y aditivo (1.09).

Por el contrario, combinar I-CRP y epirubicina a concentraciones no-constantes (diferentes a la IC_1): $IC_{15}:IC_{60}$, $IC_{20}:IC_{35}$ e $IC_{30}:IC_{50}$, no logra ejercer un efecto sinérgico (**Tabla 10**).

Posteriormente, mediante la tinción de las células MDA-MB-231 “triple negativo” con Ann/PI, se corroboró mediante citometría de flujo el porcentaje de células muertas por tales combinaciones. Los resultados mostraron un incremento en la muerte celular por combinaciones equipotentes (**Fig. 26 H, J, L**), induciendo una muerte celular cercana al ~100% a partir de la combinación con la CC_{60} de ambos medicamentos (**Fig. 26 G, I, K**). Las concentraciones aplicadas en combinación fueron: ICRP $CC_{20}= 0.97$ UI/mL, $CC_{60}= 1.34$ UI/MI y $CC_{70}= 1.39$ UI/mL. Epirubicina $CC_{20}= 88$ μ M, $CC_{50}= 200$ μ M y $CC_{60}= 220$ μ M.

Las microscopías de luz demuestran que el tratamiento combinado a dosis equipotentes induce cambios morfológicos de muerte similares a los dados por el I-CRP sólo (**Fig. 27**). Se observa permeabilidad de la membrana celular, detritos celulares, una clara disminución del número de células, y las células viables restantes no presentan un núcleo ensanchado, característico del tratamiento con epirubicina.

Tabla 10. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & epirubicina en células MDA-MB-231 “triple negativo”, in vitro.

<i>Dosis</i>		<i>Concentración inhibitoria</i>		<i>Porcentaje de inhibición de células MDA-MB-231</i>	<i>p significativa</i>
<i>I-CRP</i> <i>UI/mL</i>	<i>EPI</i> μ <i>M</i>	<i>I-CRP</i>	<i>EPI</i>		
0.25	20.74	1	20	51.93% \pm 2.03	0.001
0.25	34.14	1	30	55.22% \pm 3.99	0.001
0.25	50.37	1	40	64.71% \pm 4.19	0.001
0.25	74.74	1	50	51.03% \pm 1.72	ns
0.25	108.74	1	60	57.88% \pm 2.89	ns
0.62	1.06	20	1	57.17% \pm 3.75	0.001
0.71	1.06	30	1	65.35% \pm 4.22	ns
0.9	1.06	50	1	56.23% \pm 1.56	ns
1.01	1.06	60	1	80.76% \pm 2.65	0.0001/0.001
0.56	15.03	15	15	48.72% \pm 1.04	0.0001/0.0001
0.56	108.74	15	60	52.22% \pm 12.22	0.0001/ns
0.62	42.17	20	35	49.71% \pm 0.50	0.0001/0.05
0.71	34.14	30	30	71.72% \pm 2.5	0.0001/0.05
0.71	74.74	30	50	65.87% \pm 4.4	0.0001/0.0001
0.80	51.37	40	40	67.51% \pm 1.77	0.001/0.0001

Células MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina durante 24 hrs, al termino del cual, la viabilidad celular se analizó mediante Alamar blue y se expresó como porcentaje, considerando la fluorescencia del control como el 100%. Finalmente, la inhibición fue expresada al restar al 100% la viabilidad. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. *P significativa* valorando el resultado de la combinación con el tratamiento individual: I-CRP/ epirubicina.

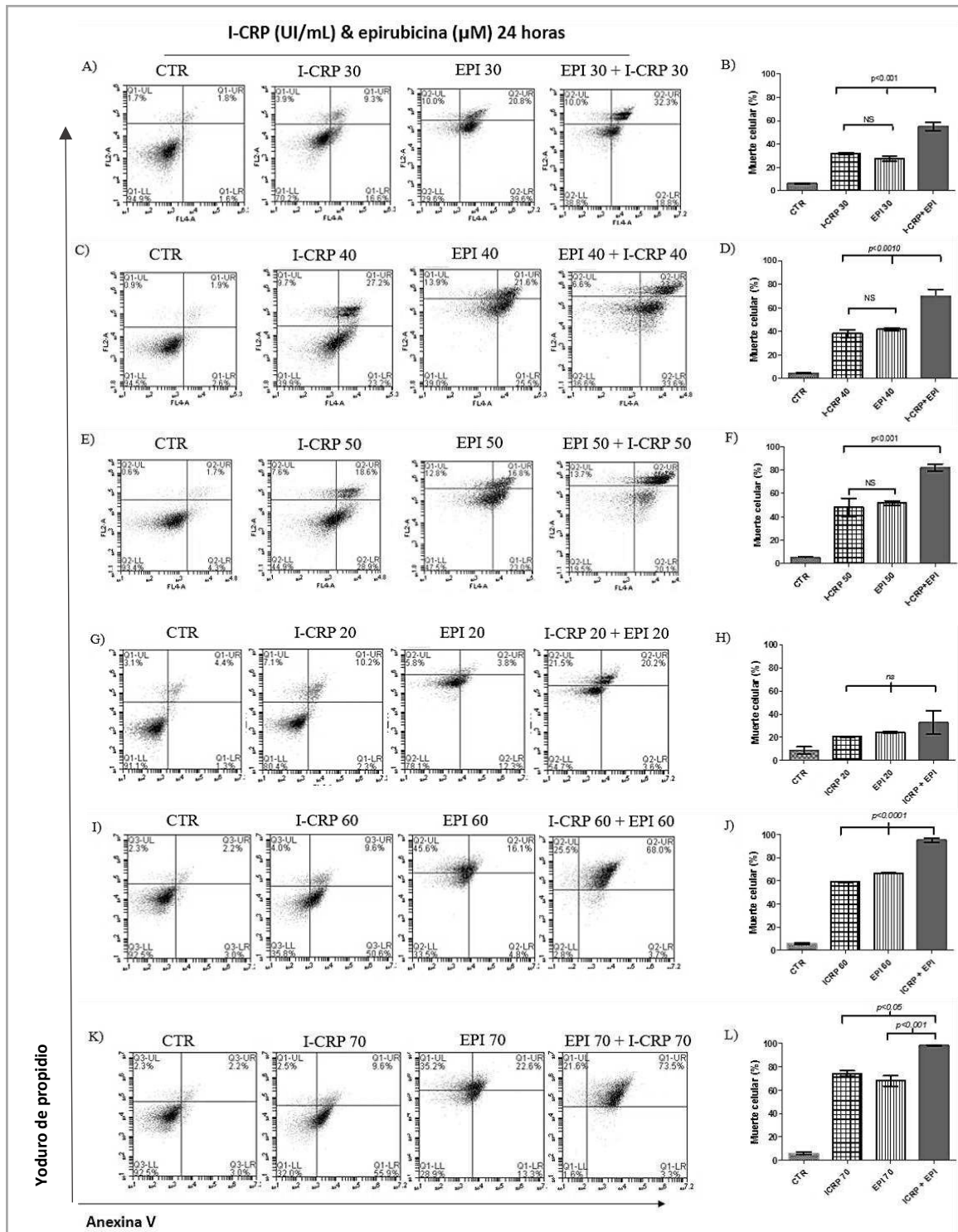


Figura 26. Dosis equipotentes de I-CRP y epirubicina en combinación incrementan la muerte de células de cáncer de mama (A, C, E) Células MCF-7 y (G, I, K) células MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (B, D, F, H, J, L) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE.

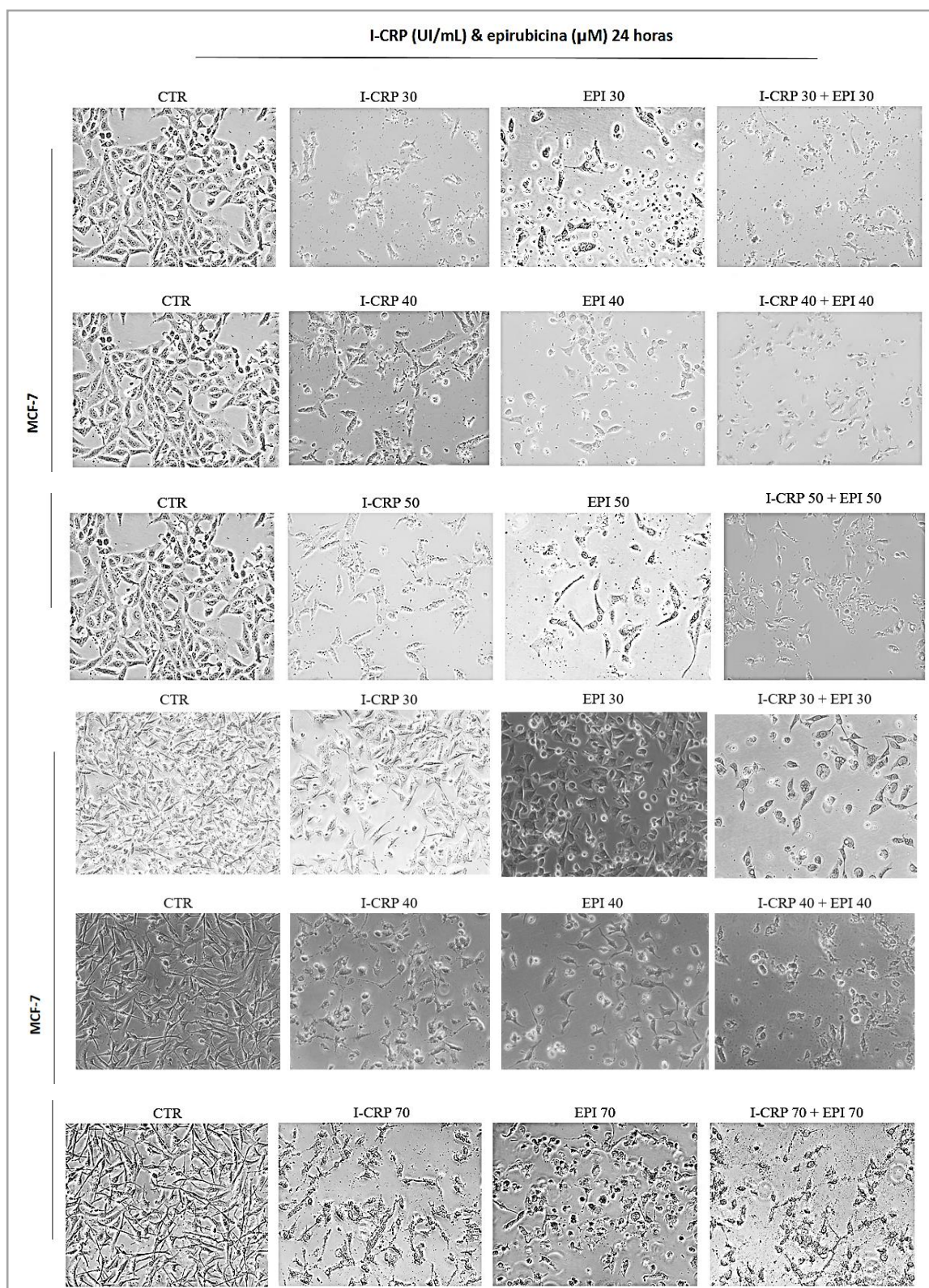


Figura 27. Morfología de muerte celular dada por el tratamiento combinado de I-CRP y epirubicina a dosis equipotentes en células de cáncer de mama. Células MCF-7 y MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

5.11 Análisis de la combinación del I-CRP con ciclofosfamida en líneas tumorales de cáncer de mama.

5.11.1 Concentraciones mínimas I-CRP incrementan aditivamente el efecto antitumoral de ciclofosfamida en MCF-7

Inicialmente, buscando reducir al máximo la dosis del I-CRP, equiparando la dosis que se usan actualmente en clínica, se llevaron a cabo combinaciones con concentraciones de I-CRP correspondiente a la IC₁ (0.42 UI/mL) en conjunto con concentraciones crecientes de ciclofosfamida: 8.25 (IC₁₀), 9.81 (IC₁₅), 12.44 (IC₂₀), 13.66 (IC₃₀), 14.88 (IC₃₅), 16.11 (IC₄₀) ó 18.74 milimoles (IC₅₀), en MCF-7. Tales combinaciones redujeron la actividad metabólica celular en un porcentaje mayor al inducido por la ciclofosfamida sola, siendo significativo en las combinaciones: IC₁:IC₁₅, IC₁:IC₂₅, IC₁:IC₃₅ e IC₁:IC₄₀ (**Fig. 28 A**). En estas combinaciones, el I-CRP ejerció un efecto aditivo sobre la ciclofosfamida, al obtener un índice combinacional de: 1.06, 0.96, 1.04, y 1.06, respectivamente, como se muestra en el isoblograma (**Fig. 28 B**). Se realizaron, además, las combinaciones IC₁:IC₆₀ e IC₁:IC₇₀, las cuales aumentaban significativamente la inhibición hasta 72.54±2.41% y 79.36±1.26%, respectivamente, siendo este también un efecto aditivo, al obtener un índice combinacional de 1.06 en ambas (**Tabla 11**).

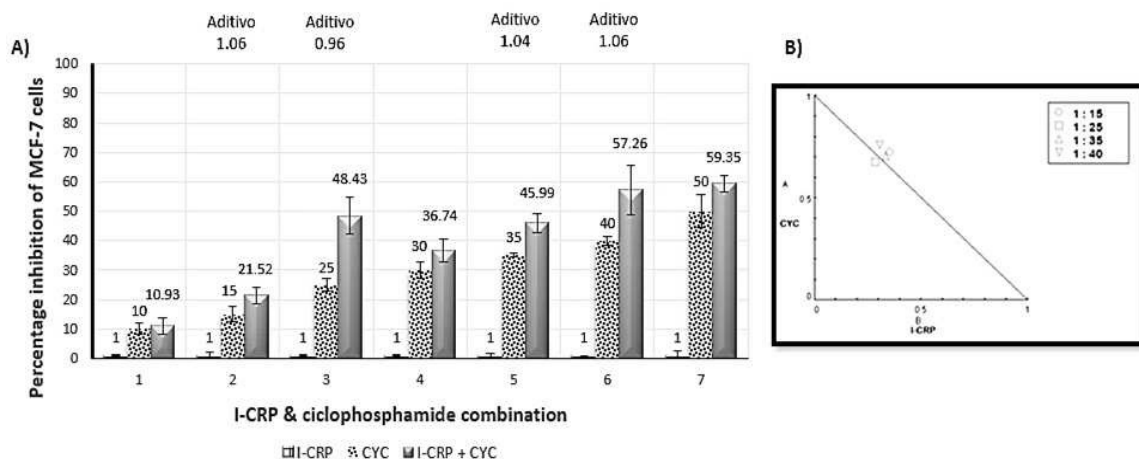


Figura 28. Efecto aditivo del I-CRP sobre células MCF-7 tratadas con ciclofosfamida. (A) Las células fueron tratadas tanto con el I-CRP como con ciclofosfamida (IC_1) durante 24 hrs, posteriormente la viabilidad celular se midió mediante el método de Alamar blue. (B) Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), expresada gráficamente mediante el isoblograma normalizado, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado \pm DE.

5.11.2 Concentraciones mínimas I-CRP incrementan aditivamente el efecto antitumoral de ciclofosfamida en MDA-MB-231 “triple negativo”.

Células “triple negativo” fueron tratadas con I-CRP (IC_1) y ciclofosfamida (IC_{15} , IC_{25} , IC_{35} , IC_{40} ó IC_{50}), durante 24 hrs. Posteriormente la disminución en la actividad metabólica por los tratamientos fue evaluada mediante Alamar Blue (resazurina). Los resultados mostraron que las combinaciones $IC_1:IC_{15}$, $IC_1:IC_{25}$ e $IC_1:IC_{35}$ incrementaban el porcentaje de inhibición, aunque no significativamente, en comparación con la quimioterapia sola (**Fig. 29 A**). Por otro lado, las combinaciones $IC_1:IC_{40}$ e $IC_1:IC_{50}$, incrementaron significativamente el efecto inhibitorio dado por la ciclofosfamida (**Fig. 29 A**). Tales combinaciones fueron analizadas mediante el software Compusyn®, arrojando índices combinacionales aditivos de 1.05 y 1.04, respectivamente (**Fig. 29 B**).

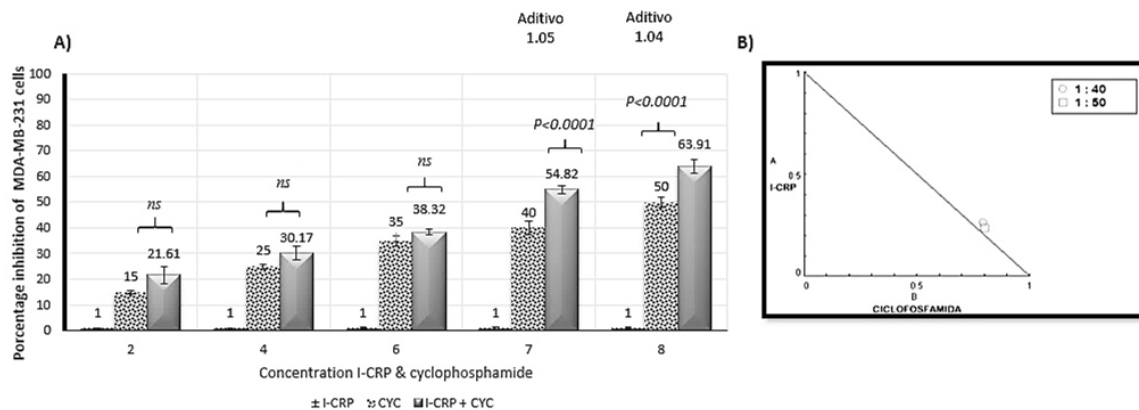


Figura 29. Efecto aditivo del I-CRP sobre células MDA-MB-231 tratadas con ciclofosfamida. (A) Las células fueron tratadas tanto con el I-CRP como con la ciclofosfamida (IC_1) durante 24 hrs, posteriormente la viabilidad celular fue evaluada utilizando el método de Alamar blue. (B) Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), expresada gráficamente mediante el isoblograma normalizado, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado \pm DE.

5.11.3 Concentraciones mínimas de I-CRP incrementan la muerte celular inducida por la ciclofosfamida, de manera variable en MCF-7 y MDA-MB-231.

Se observó, de manera general, que las combinaciones en estos radios no producían un incremento significativo en la exposición de fosfatidilserina y la permeabilización de la membrana celular en MCF-7, con excepción de la combinación CC_1 -I-CRP: CC_{10} -CYC (**Fig. 30 B, D, F, H**). Las combinaciones $CC_1:CC_{10}$, $CC_1:CC_{25}$, $CC_1:CC_{40}$, y $CC_1:CC_{50}$, obtuvieron un resultado de $22 \pm 1.67\%$, $26.41 \pm 5.16\%$, $24.34 \pm 5.18\%$, y $51.45 \pm 2.47\%$, respectivamente. Sin embargo, cambios morfológicos considerables se presentaban conforme la concentración de ciclofosfamida se incrementaba en la combinación, observándose un aumento, cada vez mayor, del número de células desadheridas, obteniendo un 100% de desadherencia a partir de la CC_{50} , similar a lo observado en el tratamiento con ciclofosfamida, pero en menor medida (**Fig. 31**). El efecto aditivo en la inhibición celular de estos radios, no se debe, por lo tanto, a un aumento en la muerte celular.

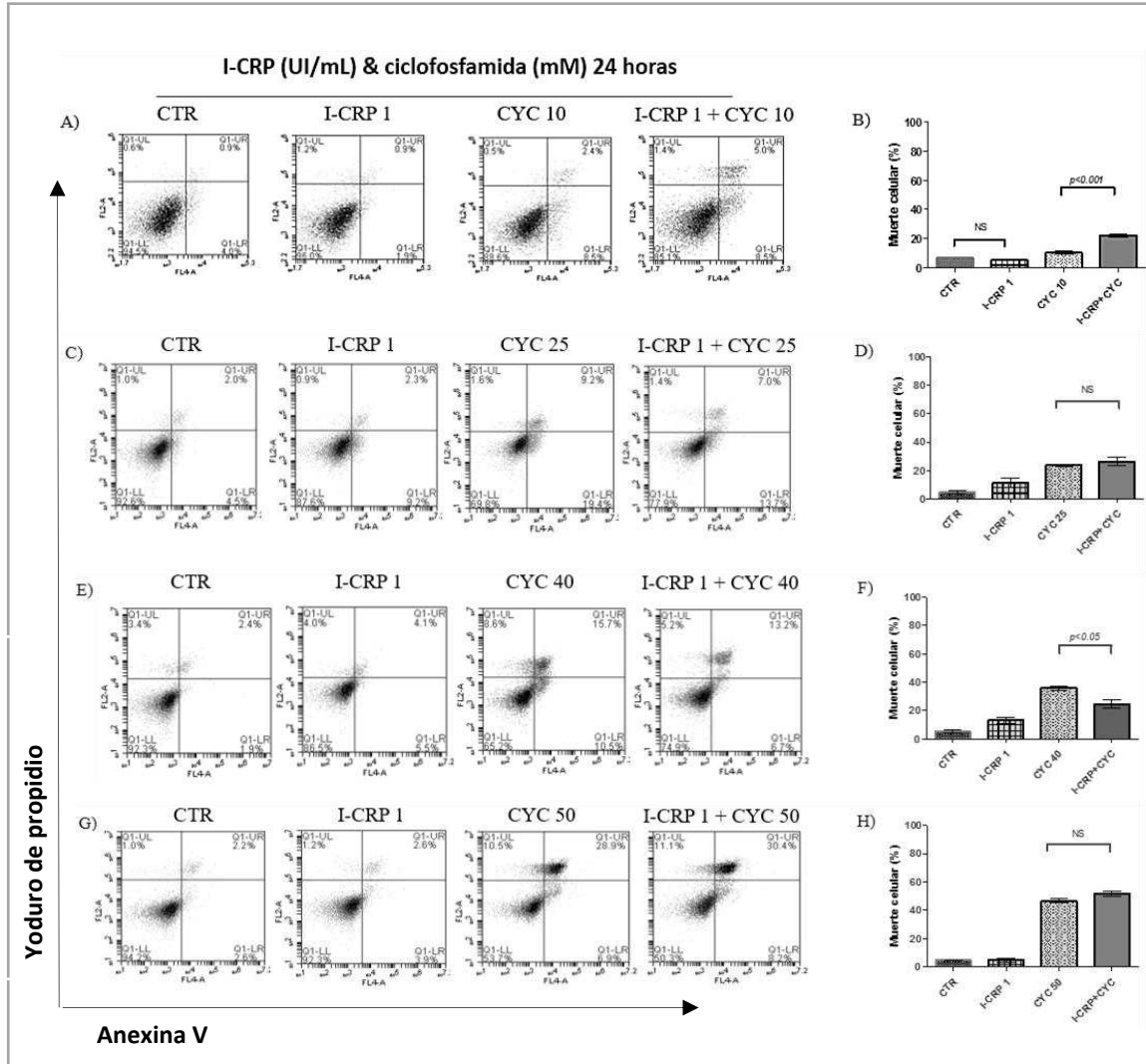


Figura 30. El I-CRP (IC_1) incrementa varibalemente la muerte celular inducida por la ciclofosfamida en MCF-7. (A, C, E, G) Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (B, D, F, H) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. ICRP $CC_1= 0.56$ UI/mL. Cyclophosphamide $CC_{10}= 15.21$ mM, $CC_{25}=16.68$ mM, $CC_{40}=21.07$ mM, and $CC_{50}=22.47$ mM.

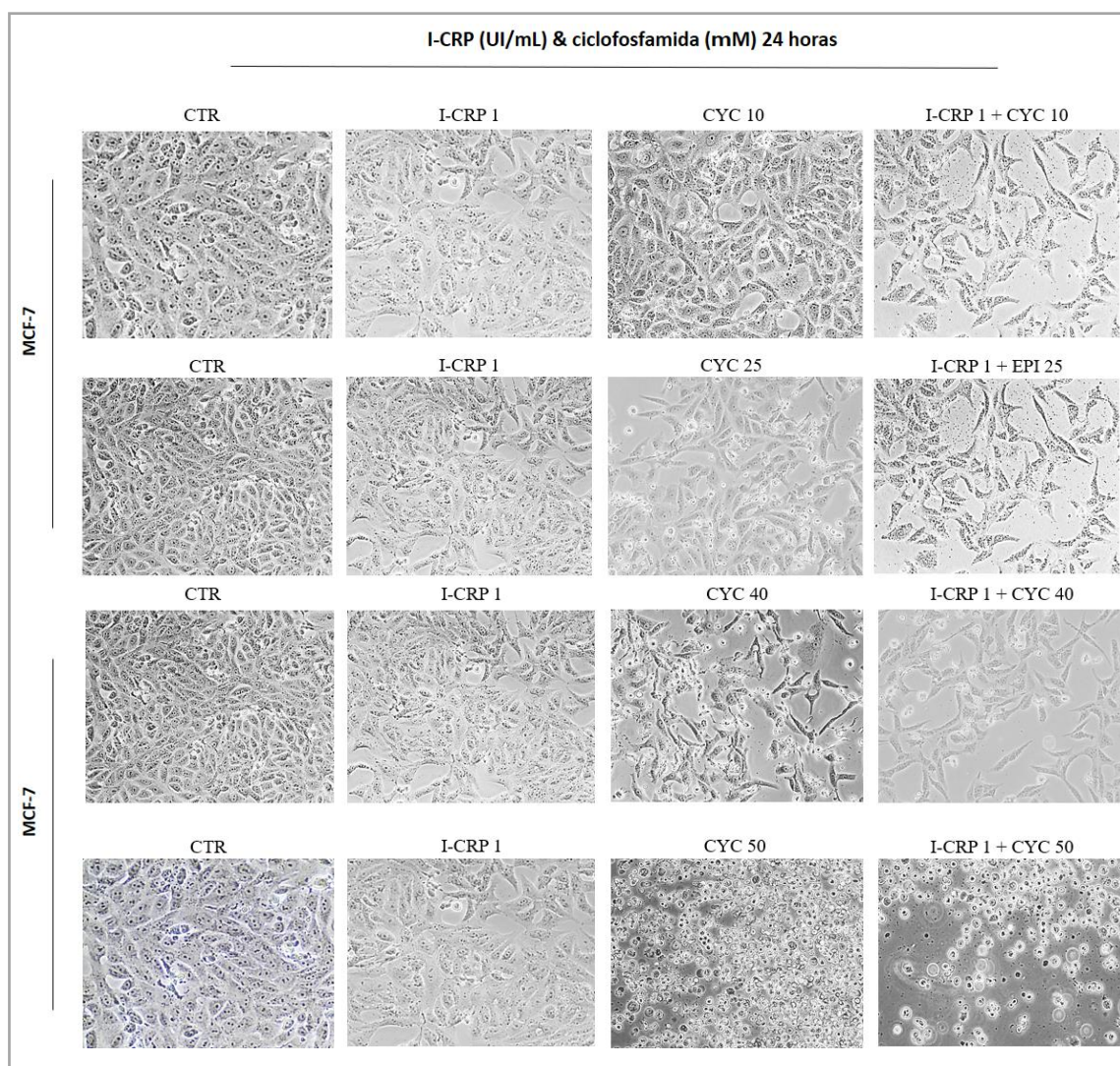


Figura 31. El I-CRP induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la ciclofosfamida en MCF-7. Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

Por el contrario, en la línea tumoral MDA-MB-231 “triple negativo”, la muerte celular inducida por la ciclofosfamida se incrementó significativamente con la adición de I-CRP (CC₁) (**Fig. 32**). Los resultados mostraron que las combinaciones CC₁:CC₄₀, CC₁:CC₅₀, y CC₁:CC₈₀, inducían un porcentaje de muerte celular de $84.97 \pm 7.30\%$, $83.20 \pm 15.68\%$ y $90.77 \pm 1.27\%$, respectivamente, un porcentaje significativamente mayor en comparación

con la ciclofosfamida sólo (**Fig. 32 B, D, F**). Se observó, además, que las células en el grupo combinado presentaban un cambio en la morfología celular similar al dado por el tratamiento con ciclofosfamida, con una clara reducción en la densidad celular (**Fig. 33**).

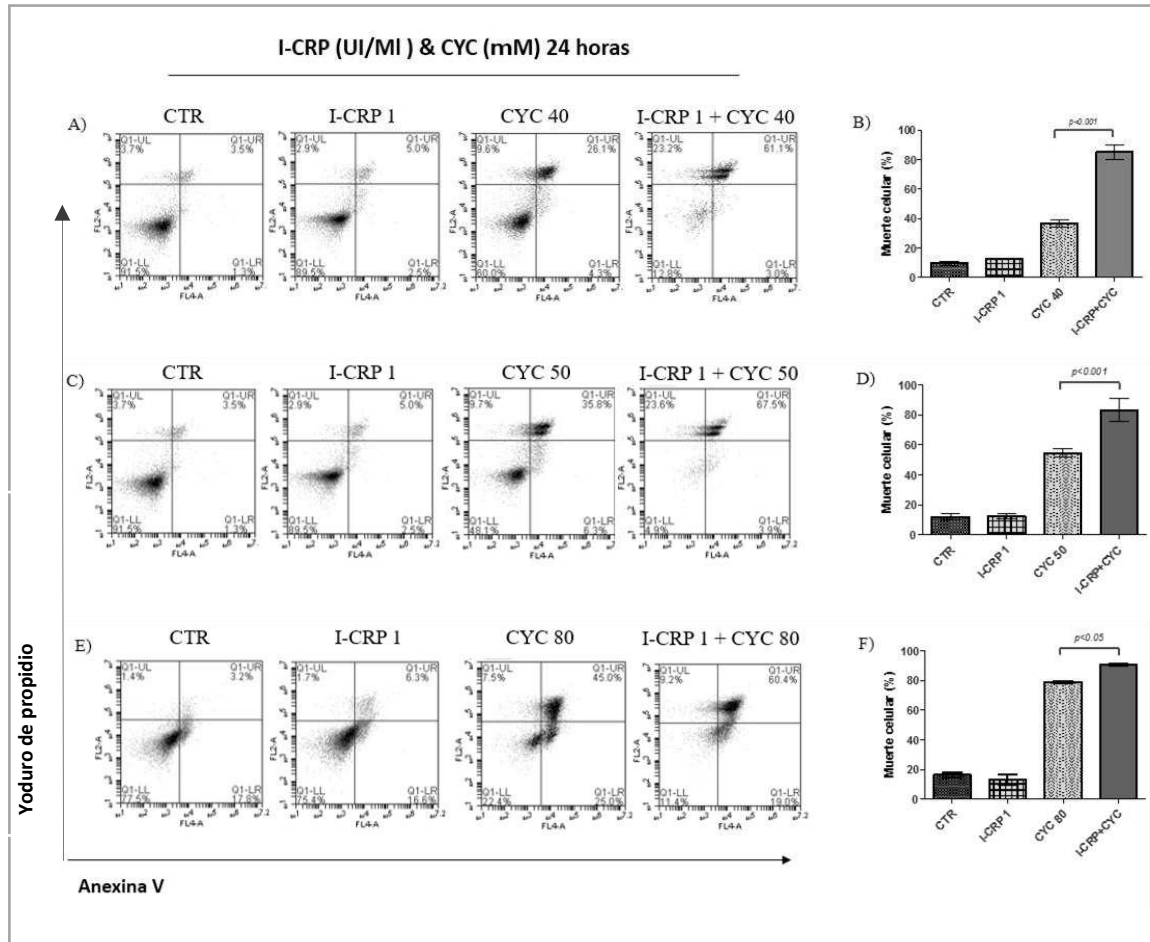


Figura 32. El I-CRP (IC₁) incrementa significativamente la muerte celular inducida por la ciclofosfamida en MDA-MB-231 “triple negativo” (A, C, E) Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (**B, D, F**) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. ICRP CC₁= 0.25 UI/mL. CYC CC₄₀=28.76mM, CC₅₀=34.12mM, CC₈₀=48.23 mM.

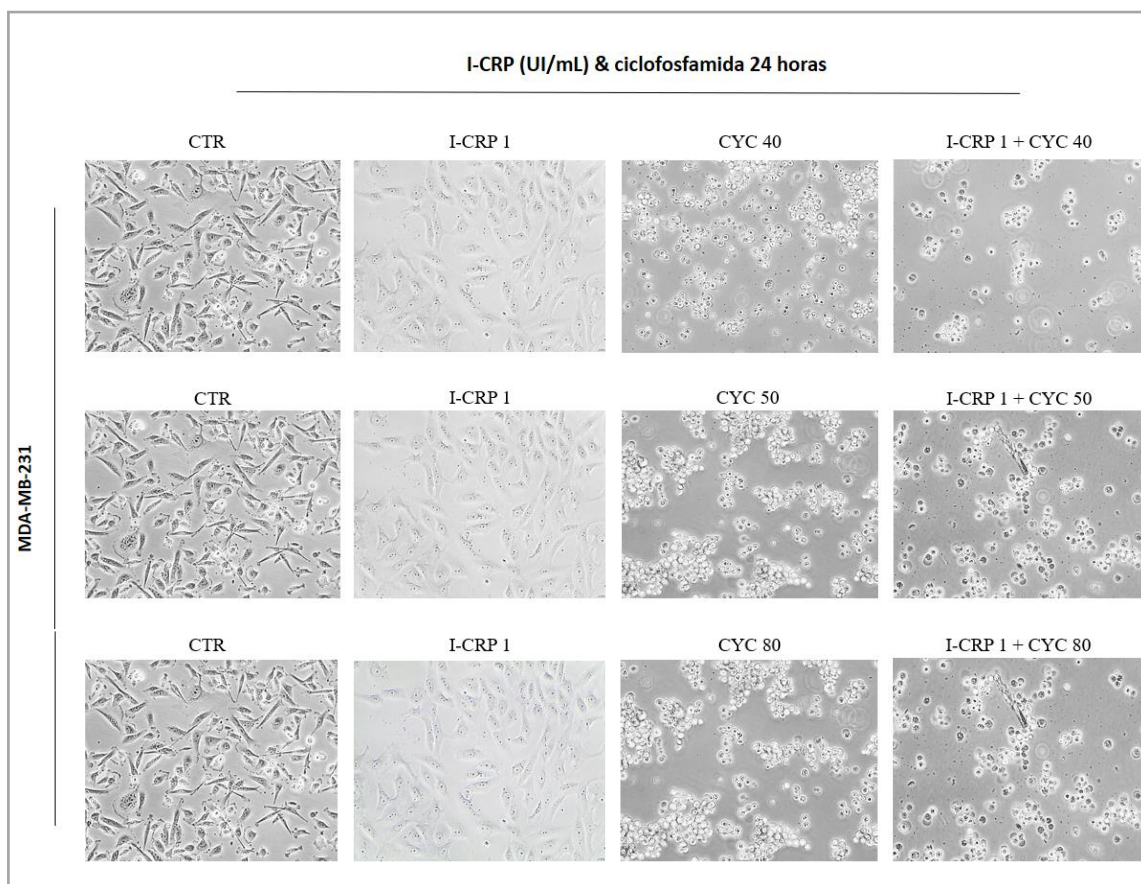


Figura 33. El I-CRP induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la ciclofosfamida en células MDA-MB-231 “triple negativo”. Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

5.12 Análisis de la combinación de la ciclofosfamida con el Immunepotent-CRP.

5.12.1 Concentraciones mínimas de ciclofosfamida incrementan aditivamente el efecto antitumoral del I-CRP en MCF-7

Posteriormente, utilizando el método de Alamar blue, se llevaron a cabo combinaciones con concentraciones bajas de ciclofosfamida ó 3.37 mM (IC₁) con las concentraciones 0.77 (IC₁₀), 0.85 (IC₁₅), 0.99 (IC₂₅), 1.06 (IC₃₀), 1.12 (IC₃₅), 1.18 (IC₄₀), ó 1.30 UI/mL (IC₅₀) de I-CRP; y se observó, que la inhibición dada por todas ellas era

significativamente mayor comparada con el tratamiento con I-CRP (**Tabla 11**). El porcentaje inhibitorio alcanzado por las combinaciones IC₁₀:IC₁, IC₁₅:IC₁, IC₂₅:IC₁, IC₃₀:IC₁, IC₃₅:IC₁, IC₄₀:IC₁ y IC₅₀:IC₁, fue de 38.99±4.75%, 28±4.8%, 43.99±2.68%, 40.78±0.76%, 64.48±4%, 64.75±3.8% y 78.75±0.4%, respectivamente (**Fig. 34 A**). De estas, las combinaciones 15:1, 25:1, 30:1 y 40:1, obtuvieron un CI aditivo de 1.07, 0.97, 1.09 y 0.97, respectivamente. Por otro lado, las combinaciones 10:1, 35:1 y 50:1, obtuvieron un efecto ligeramente sinérgico, con índices de 0.863, 0.861 y 0.87 respectivamente (**Fig. 34 B**), permitiendo reducir la quimioterapia 1.53, 1.39 y 1.31 veces. Lo anterior permite concluir que la ciclofosfamida ejerce un efecto aditivo y sinérgico sobre la citotoxicidad dada por el I-CRP.

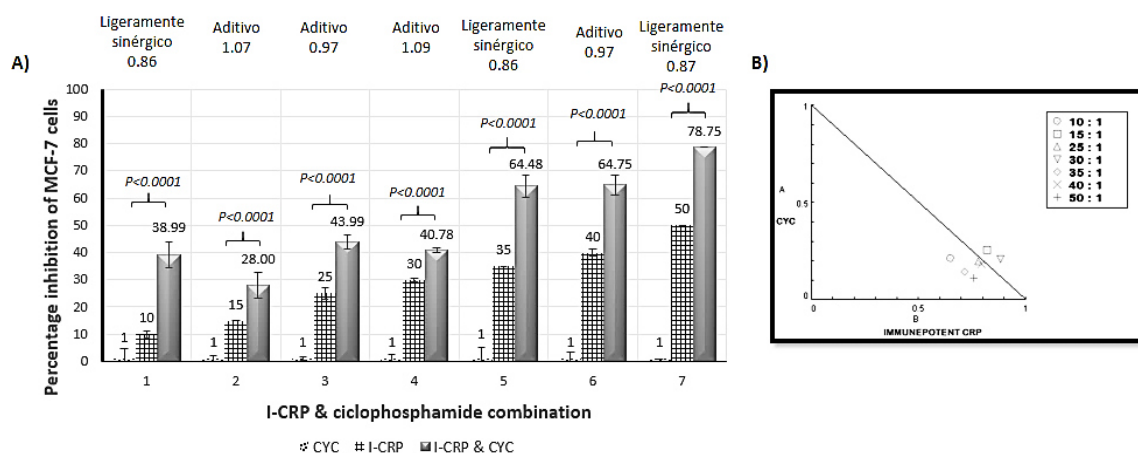


Figura 34. Efecto aditivo de la ciclofosfamida sobre células MCF-7 tratadas con I-CRP. (A) Las células fueron tratadas tanto con el I-CRP como con ciclofosfamida (IC₁) durante 24 hrs, posteriormente la viabilidad celular fue evaluada utilizando el método de Alamar blue. (B) Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), gráficamente medida mediante el isoblograma, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado ±DE.

5.12.2 Concentraciones mínimas de ciclofosfamida incrementan aditivamente el efecto antitumoral del I-CRP en MDA-MB-231.

Utilizando la misma metodología con Alamar Blue, concentraciones mínimas de ciclofosfamida (IC_1) se combinaron con concentraciones mayores de I-CRP en MDA-MB-231 “triple negativo”. La combinación de ciclofosfamida (IC_1) con las concentraciones IC_{10} , IC_{15} , IC_{20} , IC_{25} , IC_{30} , IC_{35} e IC_{40} de I-CRP, obtuvieron un efecto inhibitorio mayor al dado por el I-CRP sólo (**Fig. 35 A**). Las combinaciones con diferencias significativas $IC_1:IC_{25}$, $IC_1:IC_{30}$, $IC_1:IC_{35}$ e $IC_1:IC_{40}$, tuvieron un efecto inhibitorio aditivo al lograr un índice combinacional de 1.04, 1.01, 1.05 y 1.06, respectivamente (**Fig. 35 B**).

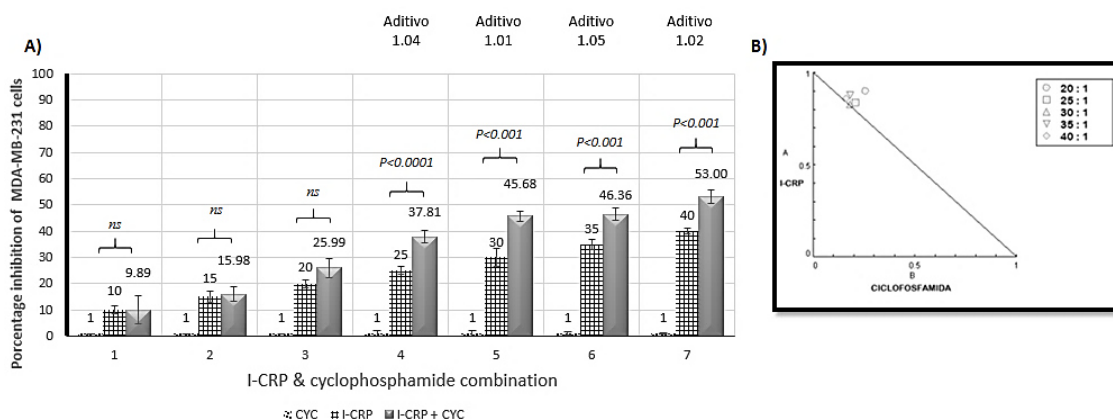


Figura 35. Efecto aditivo de la ciclofosfamida sobre células MDA-MB-231 tratadas con I-CRP. (A) Las células fueron tratadas tanto con el I-CRP como con ciclofosfamida (IC_1) durante 24 hrs, posteriormente la viabilidad celular fue evaluada utilizando el método de Alamar blue. (B) Los resultados fueron analizados utilizando el software Compusyn, a través del cual la interacción farmacológica (índice de cuantificación), gráficamente medida mediante el isoblograma, fue cuantificada. Los datos representan la media de tres experimentos independientes, realizados por triplicado \pm DE.

5.12.3 Concentraciones mínimas de ciclofosfamida incrementan la muerte celular inducida por el I-CRP, de manera variable en MCF-7 y MDA-MB-231.

Los ensayos con Ann/PI mediante citometría de flujo determinaron que la adición de dosis mínimas de ciclofosfamida (CC₁) al tratamiento con I-CRP inducía una muerte de células MCF-7 significativamente mayor a la dada por el I-CRP sólo (**Fig. 36 B, D, F, H**). Demostrando que el efecto aditivo dado en la inhibición celular es consecuencia a un aumento en la exposición de la fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular (**Fig. 36 A, C, E, G**). Las combinaciones CC₁₀:CC₁, CC₂₀:CC₁, CC₄₀:CC₁, y CC₅₀:CC₁, obtuvieron una muerte celular de 13.9±0.74%, 45±10.21%, 87.75±2.42, y 94.61±0.80%, respectivamente. Adicionalmente, se logró evidenciar, través de las microscopías de luz, que la adición de ciclofosfamida (CC₁) impide la formación de vacuolas por el I-CRP (demostradas en otro trabajo como autofagosomas) (**Fig. 37**), las cuales tienen un efecto citoprotector.

Por el contrario la adición de ciclofosfamida (IC₁) al tratamiento con I-CRP no incrementaba significativamente la muerte de células MDA-MB-231 “triple negativo” (**Fig. 38 J, L, N**). Las combinaciones CC₁₀:CC₁, CC₅₀:CC₁, y CC₈₀:CC₁, obtuvieron una muerte celular no significativa de 13.61±3.26%, 64.73±5.15%, y 86.17±10.98%, respectivamente. La adición de ciclofosfamida (IC₁) no inducía tampoco, un cambio en la morfología de muerte celular (**Fig. 39**). Lo que permite descartar la muerte celular, como el mecanismo responsable del incremento aditivo inhibitorio de tales combinaciones.

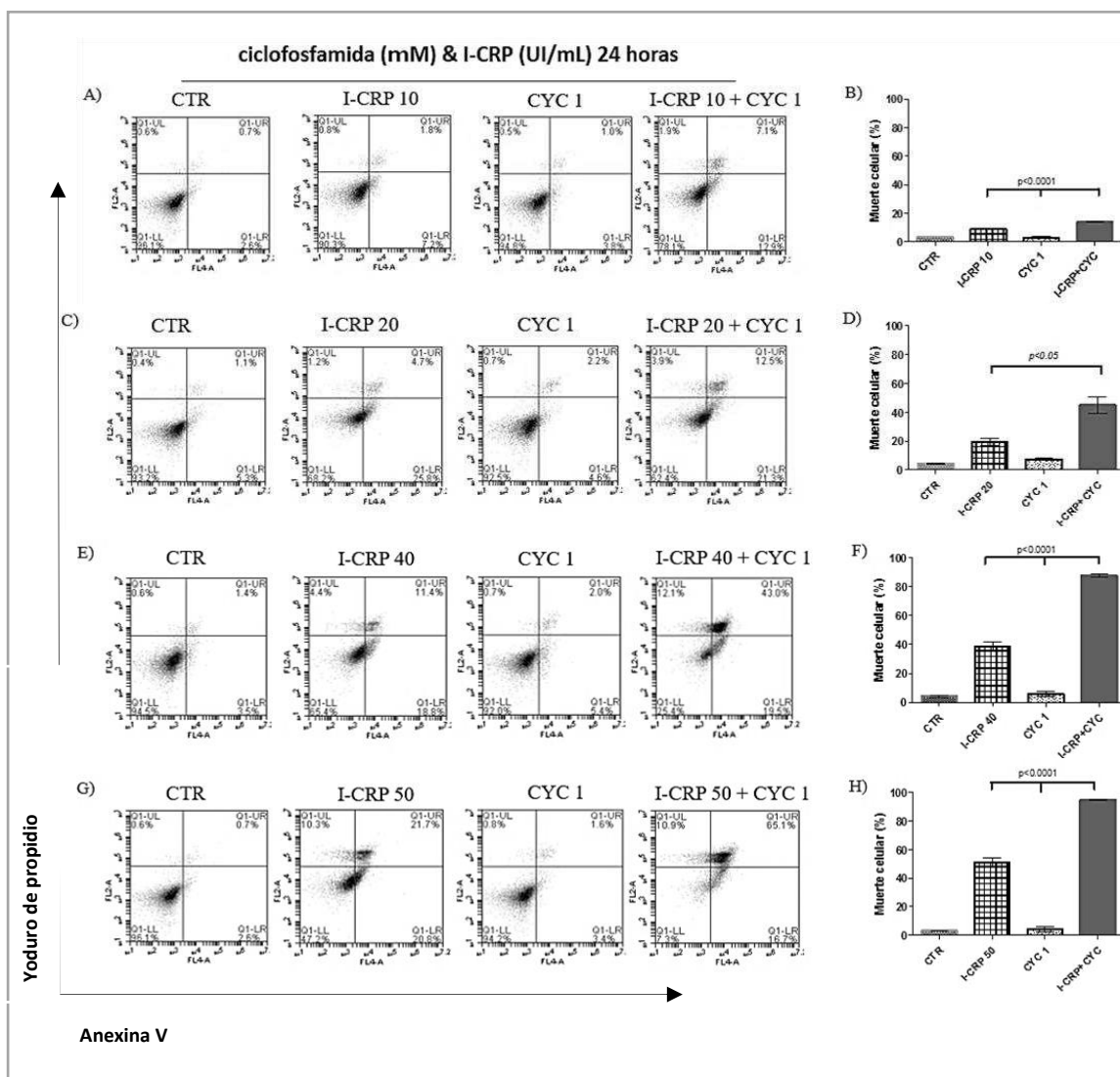


Figura 36. La ciclofosfamida (IC₁) incrementa significativamente la muerte celular inducida por el I-CRP en células MCF-7. (A, C, E, G) Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. **(B, D, F, H)** Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. Ciclofosfamida CC₁=4.97 μ M. ICRP CC₁₀=0.81 UI/mL, CC₂₀=1.01 UI/mL, CC₄₀=1.34 UI/mL, and CC₅₀=1.41 UI/mL.

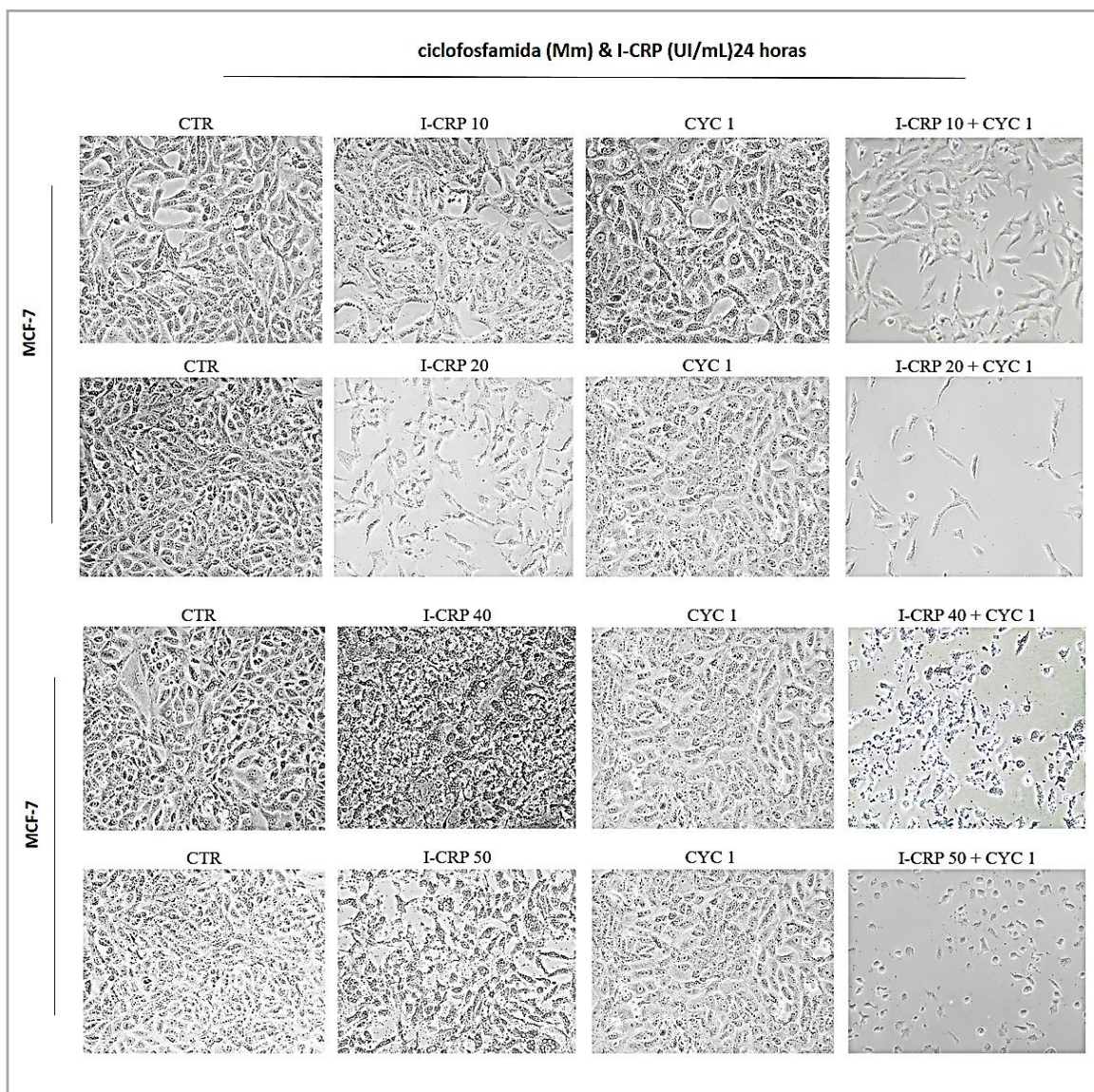


Figura 37. La ciclofosfamida induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la el I-CRP en células MCF-7. Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

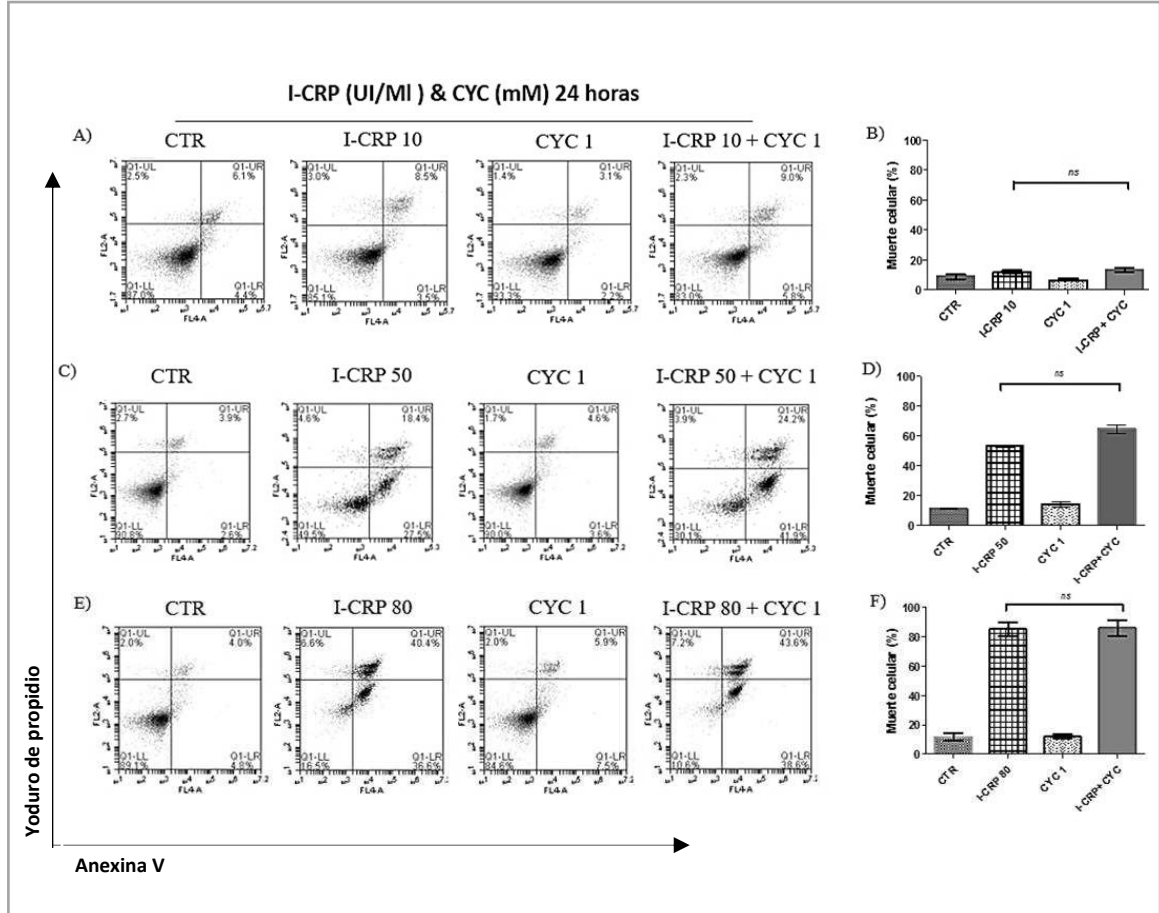


Figura 38. La ciclofosfamida (IC₁) no incrementa significativamente la muerte celular inducida por el I-CRP en células MDA-MB-231. (A, C, E) Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (B, D, F) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. Ciclofosfamida CC₁=4.93 mM. ICRP CC₁₀=0.61 UI/mL, CC₅₀=1.32 UI/mL, and CC₈₀=2.20 UI/mL.

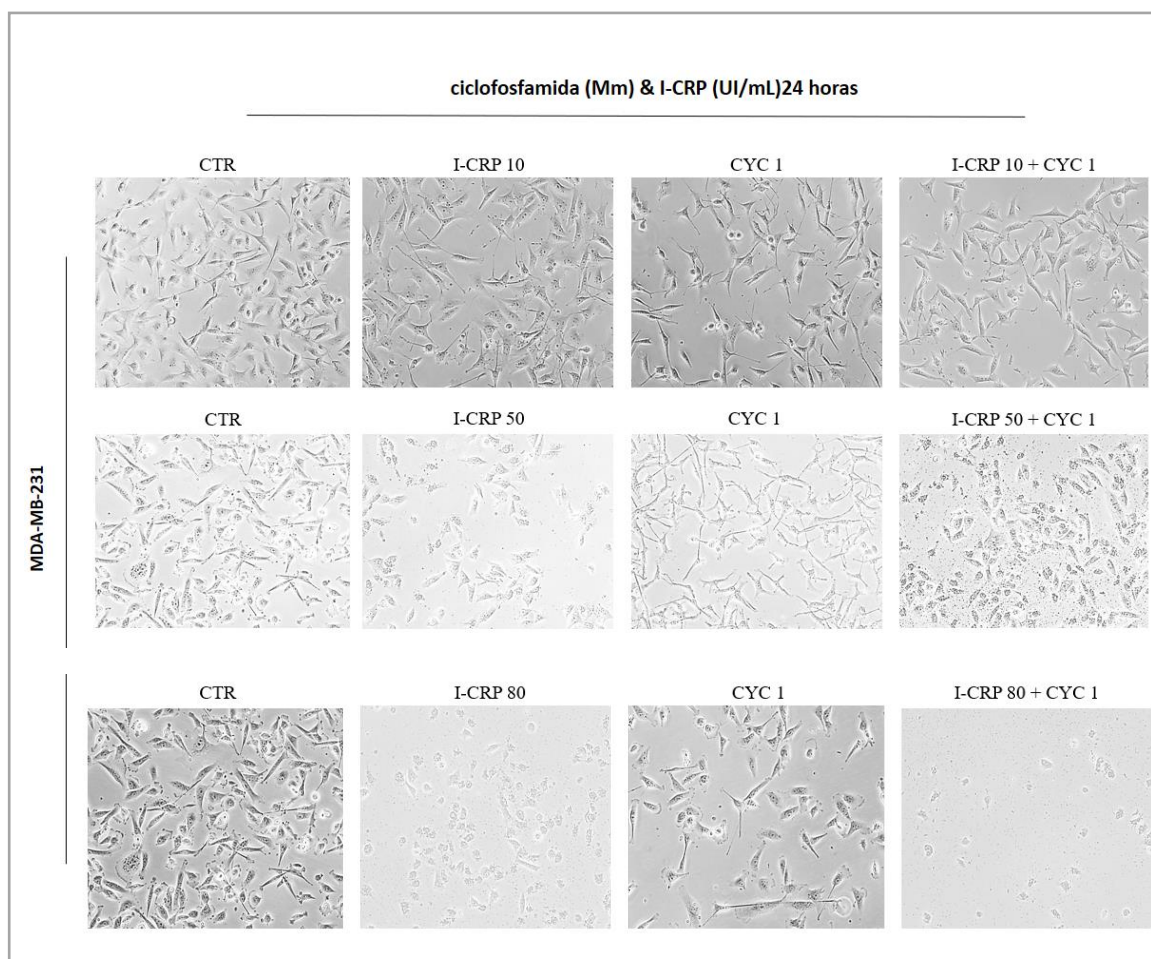


Figura 39. La ciclofosfamida no induce cambios en la morfología de muerte celular dada por la el I-CRP en células MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

5.13 Análisis de la combinación de I-CRP & ciclofosfamida a concentraciones equipotentes, en MCF-7 y MDA-MB-231.

En los ensayos con resazurina la combinación $IC_{30}:IC_{30}$, resultado de combinar 1.06 UI/mL y 13.66 mM, de I-CRP y ciclofosfamida, respectivamente, obtuvo una inhibición de 63.70% ($p<0.05/ p<0.05$), un resultado significativamente mayor al dado por los tratamientos solos; sin embargo, menor a la suma de estos (CI 1.30) (**Tabla 11**). Posteriormente se llevó a cabo la combinación $IC_{30}:IC_{40}$, con 1.06 UI/mL y 16.11 mM, de I-CRP y ciclofosfamida, respectivamente, induciendo una inhibición de 93.49% ($p<0.0001/p<0.001$), mayor a la suma de ambos, obteniendo un efecto sinérgico moderado (CI 0.74) (**Tabla 11**). Con ello, se observó que incrementar las concentraciones de ciclofosfamida a concentraciones inhibitorias $\geq IC_{40}$ en combinación con concentraciones $>IC_{30}$ de I-CRP, brindaban un mayor efecto inhibitorio.

Para demostrarlo se llevó a cabo una combinación a radio-constante o equi-potente, con 1.3 UI/mL de I-CRP (IC_{50}) y 18.74 mM (IC_{50}) de ciclofosfamida; y una combinación no-constante con 1.51 UI/mL de I-CRP (IC_{60}) y 16.11 mM (IC_{40}) de ciclofosfamida. Las combinaciones lograron una inhibición de 87.28% ($p<0.05/ p<0.05$) y 91.82% ($p<0.0001/p<0.0001$), obteniendo un índice combinacional aditivo de 1.10 y 0.99, respectivamente (**Tabla 11**). Los resultados de las combinaciones previas ($IC_{30}:IC_{40}=93.49\%$, $IC_{50}:IC_{50}=87.29\%$ y $IC_{60}:IC_{40}=91.82\%$) no presentan diferencias significativas entre sí, entendiendo la razón por la cual, aquella que emplea menores dosis ($IC_{30}:IC_{40}$), tenga un mayor beneficio o sinergismo moderado, al lograr una mayor reducción de dosis, de 3.1 (I-CRP) y 2.3 (CYC) veces.

En este ensayo, podemos concluir, finalmente, que el I-CRP ejerce un efecto aditivo general sobre la citotoxicidad inducida por la ciclofosfamida en células MCF-7. El cual se obtiene siempre con cualquier concentración de ciclofosfamida en combinación con la IC_1 de I-CRP; ó, con concentraciones $\geq IC_{40}$ de ciclofosfamida en combinación con concentraciones $>IC_{30}$ de I-CRP. Por el contrario, la ciclofosfamida (IC_1) potencia el efecto antitumoral del I-CRP de manera variable (aditiva/sinérgica).

Tabla 11. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & ciclofosfamida en células MCF-7, *in vitro*.

<i>Dosis</i>		<i>Concentración inhibitoria</i>		<i>Porcentaje de inhibición de células MCF-7</i>	<i>p significativa</i>
<i>ICRP UI/mL</i>	<i>CYC mM</i>	<i>ICRP</i>	<i>CYC</i>		
0.42	8.25	1	10	10.93% \pm 2.85	NS
0.42	9.81	1	15	30.47% \pm 2.82	$p < 0.001$
0.42	12.44	1	25	48.43% \pm 6.19	$p < 0.001$
0.42	13.66	1	30	36.74% \pm 4	NS
0.42	14.88	1	35	45.99% \pm 3.2	$p < 0.05$
0.42	16.11	1	40	57.26% \pm 8.46	$p < 0.05$
0.42	18.74	1	50	59.35% \pm 2.67	NS
0.42	21.81	1	60	72.54% \pm 2.41	$p < 0.05$
0.485	25.73	1	70	79.36% \pm 1.26	$p < 0.05$
0.76	3.37	10	1	38.99% \pm 4.75	$p < 0.0001$
0.85	3.37	15	1	28.00% \pm 4.8	$p < 0.0001$
0.88	3.37	17	1	43.55% \pm 0.49	$p < 0.0001$
0.99	3.37	25	1	43.90% \pm 2.68	$p < 0.0001$
1.06	3.37	30	1	40.70% \pm 0.76	$p < 0.0001$
1.12	6.12	35	1	64.48% \pm 4	$p < 0.0001$
1.18	3.37	40	1	64.75% \pm 3.8	$p < 0.0001$
1.3	3.37	50	1	78.75% \pm 0.4	$p < 0.05$
1.6	3.37	70	1	49.88% \pm 2.69	NS
2.35	3.37	90	1	68.11% \pm 2.43	$p < 0.0001$
0.63	9.81	5	15	32.40% \pm 0.30	$p < 0.0001/p < 0.0001$
0.76	14.88	10	35	62.41% \pm 6.82	$p < 0.001/p < 0.05$
1.06	9.81	30	15	54.87% \pm 13.26	NS
1.06	13.66	30	30	63.70% \pm 8.86	$p < 0.05$
1.06	16.11	30	40	93.49% \pm 3.6	$p < 0.0001/p < 0.001$
1.3	18.74	50	50	87.28% \pm 4.3	$p < 0.05/p < 0.05$
1.51	16.11	60	40	91.82% \pm 0.45	$p < 0.0001/p < 0.0001$

Células MCF-7 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina durante 24 hrs, al termino del cual, la viabilidad celular se analizó mediante Alamar blue, y se expresó como porcentaje, considerando la fluorescencia del control como el 100%. Finalmente, la inhibición fue expresada al restar al 100% la viabilidad. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. *P significativa* valorando el resultado de la combinación con el tratamiento individual: I-CRP/ epirubicina.

Finalmente, se realizó el estudio de la muerte celular mediante citometría de flujo, utilizando el marcaje con Ann/PI. Se observó que las combinaciones constantes de I-CRP & ciclofosfamida en MCF-7 inducían un incremento en la muerte celular, en comparación con los tratamientos por sí mismos. Se llevó a cabo las combinaciones constantes CC₂₀, CC₃₀, y CC₄₀, y las combinaciones no constantes CC₆₀:CC₄₀, obteniendo un porcentaje de muerte de 89.79% \pm 5.75, 97.33% \pm 0.19, 90.98% \pm 9.31 y 95.69% \pm 2.68, respectivamente,

un porcentaje significativamente mayor al dado por los tratamientos por sí solos (**Fig. 40 B, D, F, H**). Los porcentajes previos, no presentan diferencias significativas entre sí, prefiriendo aquella con menores dosis. Se concluye, por lo tanto, que las combinaciones constantes de I-CRP y ciclofosfamida, inducen una inhibición celular aditiva/sinergista, debido al incremento en la muerte celular (**Fig. 40 A, C, E, G**).

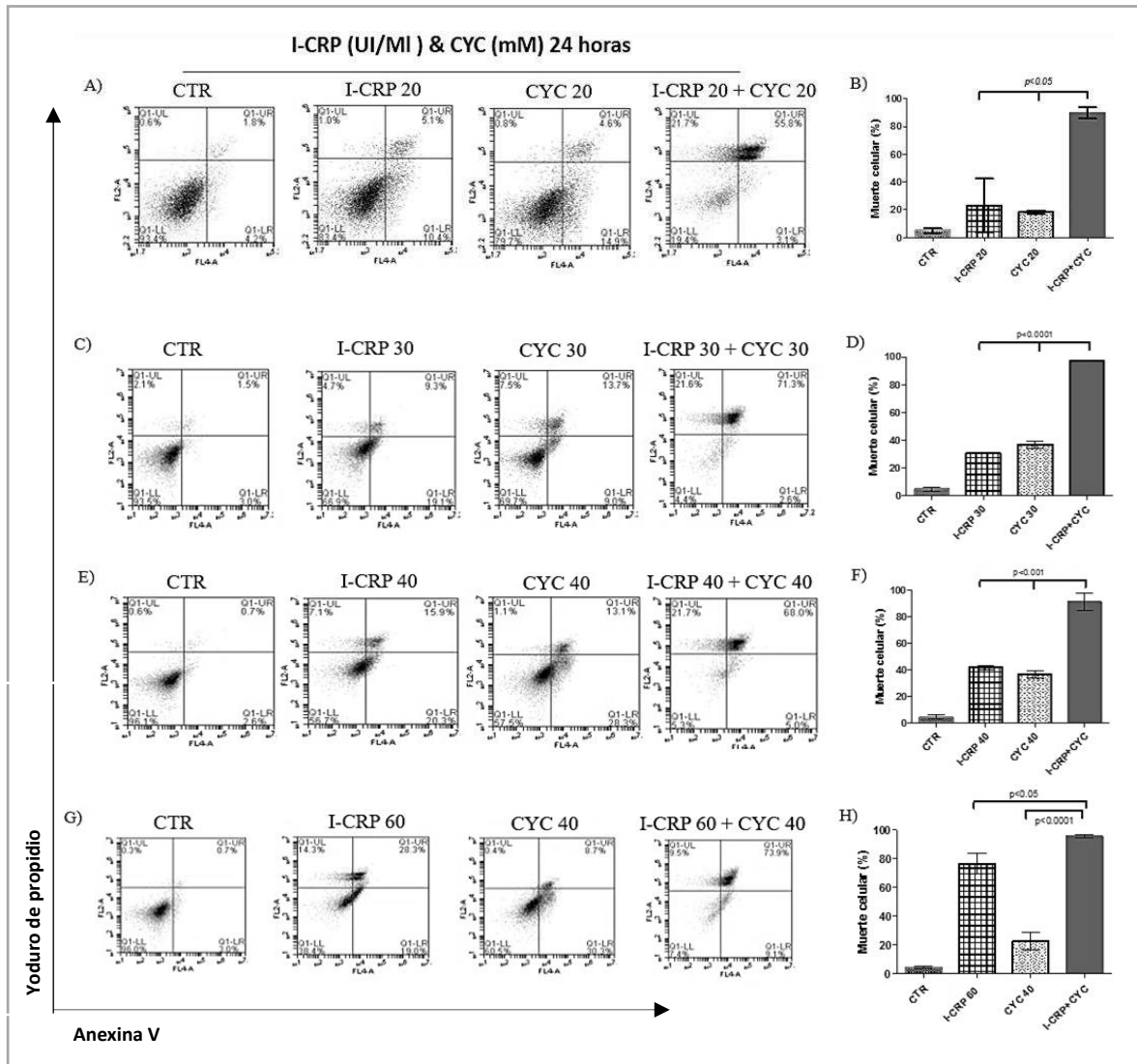


Figura 40. Dosis equipotentes de I-CRP y ciclofosfamida en combinación incrementan la muerte de células de cancer de mama MCF-7. (A, C, E, G) Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (B, D, F, H) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. ICRP/CYC CC_{20} =1.01UI/mL/ 17.04 mM; CC_{30} =1.21UI/mL/ 18.86 mM; CC_{40} =1.34UI/mL/ 21.07 mM; $CC_{60/40}$ =1.67UI/mL/ 21.07 mM.

Las microscopías de luz revelan una disminución en la densidad celular casi total (**Fig. 41 A, C, E, G**), con abundantes detritos celulares, por lo que la morfología de muerte celular es difícil de apreciar.

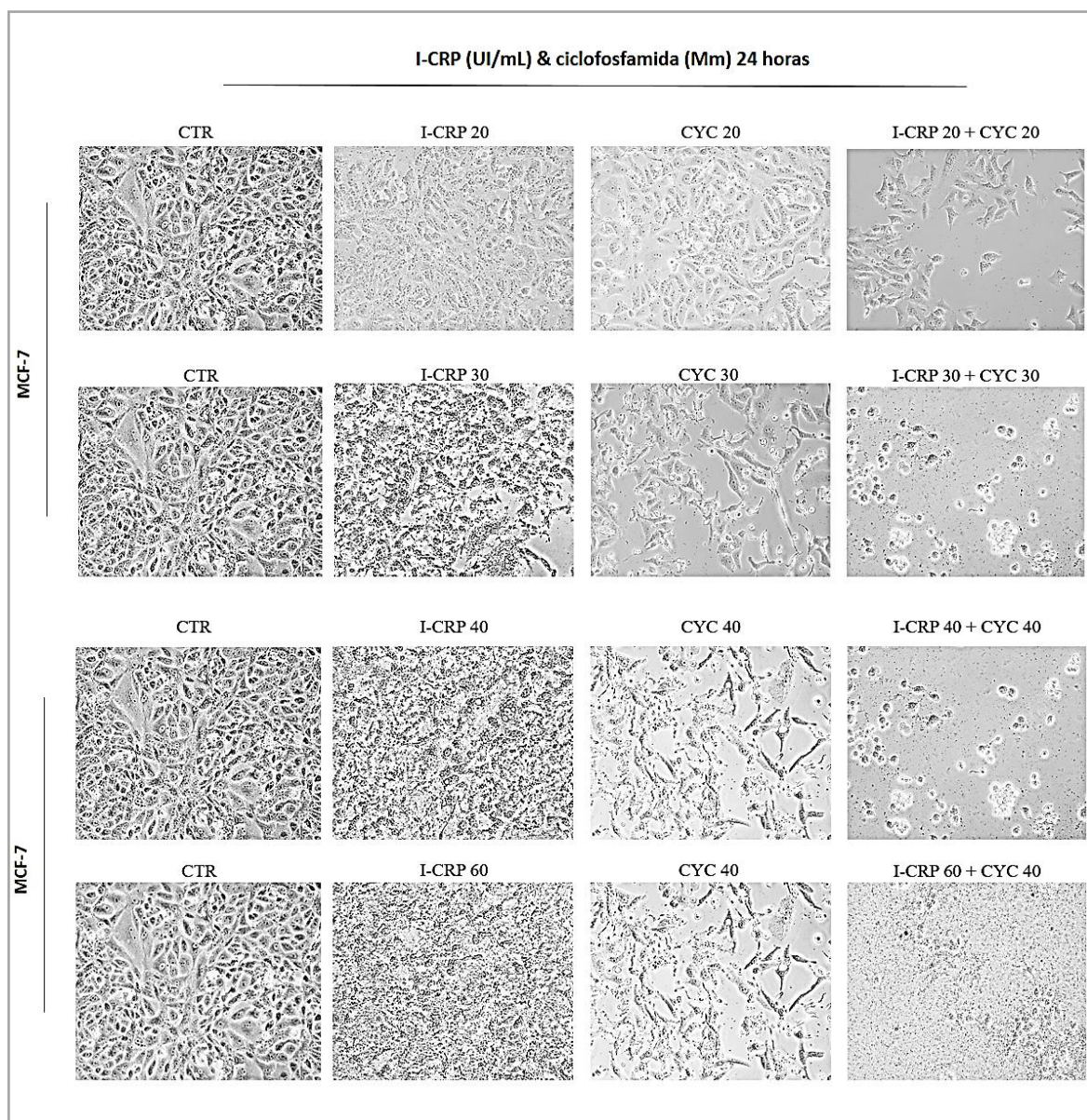


Figura 41. Morfología de muerte celular dada por el tratamiento combinado de I-CRP y ciclofosfamida a dosis equipotentes en células de cáncer de mama MCF-7. Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

Finalmente, se llevaron a cabo combinaciones variables con concentraciones diferentes a la IC_1 en MDA-MB-231. Primero se estudió el efecto de combinaciones constantes, aplicando concentraciones equipotentes de I-CRP (IC_{10}) y ciclofosfamida (IC_{10}), 0.49 μ M y 9.94 mM, respectivamente. Tal combinación, indujo una inhibición del 36.4%, significativamente mayor a la suma de los tratamientos o por sí solos (**Tabla 12**); sin embargo, el efecto de esta combinación no fue sinérgico. Se probaron por lo tanto combinaciones a ratios no-constantes, con la IC_{10} de I-CRP. Se realizaron las combinaciones $IC_{25}:IC_{60}$ y $IC_{40}:IC_{50}$, resultando en una inhibición de 93.1% y 97.71%, respectivamente, un efecto moderadamente sinérgico ($CI= 0.78$) y sinérgico ($CI= 0.55$). Concluyendo el efecto benéfico de combinar I-CRP con ciclofosfamida a concentraciones mayores a la IC_{10} de I-CRP de mal pronóstico. Esto se confirmó posteriormente mediante citometría de flujo, al medir la muerte celular con Annexin V/PI, donde se observa que combinar I-CRP & ciclofosfamida a combinaciones constantes incrementa el efecto inhibitorio de manera sinérgica debido a un incremento en la muerte celular. Las combinaciones $CC_{10}:CC_{10}$, $CC_{20}:CC_{20}$, $CC_{30}:CC_{30}$, y $CC_{40}:CC_{40}$, obtuvieron una muerte celular de $51.64 \pm 1.32\%$, 92.79 ± 7.22 , $97 \pm 2.17\%$, y 99.1 ± 0.46 ; significativamente mayor a lo dado por los tratamientos por separado. Lo anterior, muestra resultados positivos para esta línea de mal pronóstico, donde dosis tan bajas como la CC_{20} de ciclofosfamida, un potente inmunosupresor, en combinación con su contraparte equipotente CC_{20} de I-CRP, induce un efecto citotóxico antitumoral del casi 100%.

Tabla 12. Efecto de la terapia combinacional con I-CRP & ciclofosfamida en células MDA-MB-231, *in vitro*.

<i>Concentración</i>			<i>Concentraciones inhibitorias</i>		<i>Porcentaje de inhibición de células MDA-MB-231</i>	<i>p significativa</i>
<i>ICRP UI/mL</i>	<i>CYC mM</i>		<i>ICRP</i>	<i>CYC</i>		
0.25	11.87		1	15	21.61% \pm 3.16	<i>ns</i>
0.25	15.14		1	25	30.17% \pm 2.60	<i>ns</i>
0.25	18.2		1	35	38.32% \pm 1.17	<i>ns</i>
0.25	19.75		1	40	54.82% \pm 1.36	<i>p<0.0001</i>
0.25	23.08		1	50	63.91% \pm 2.72	<i>p<0.0001</i>
0.49	3.96		10	1	9.89% \pm 5.36	<i>ns</i>
0.56	3.96		15	1	15.98% \pm 2.81	<i>ns</i>
0.61	3.96		20	1	25.99% \pm 3.60	<i>ns</i>
0.66	3.96		25	1	37.81% \pm 2.33	<i>p<0.0001</i>
0.71	3.96		30	1	45.68% \pm 1.83	<i>p<0.001</i>
0.76	3.96		35	1	46.36% \pm 2.30	<i>p<0.0001</i>
0.8	3.96		40	1	53% \pm 2.50	<i>p<0.0001</i>
0.49	9.94		10	10	36.4% \pm 1.10	<i>p<0.05/p<0.05</i>
0.49	11.87		10	15	37.16% \pm 8.59	<i>p<0.05/p<0.05</i>
0.66	26.96		25	60	93.1% \pm 3.62	<i>p<0.001/p<0.05</i>
0.8	23.08		40	50	97.71% \pm 2.37	<i>p<0.0001/p<0.0001</i>

Células MDA-MB-231 fueron tratadas con I-CRP y epirubicina durante 24 hrs, al termino del cual, la viabilidad celular se analizó mediante Alamar blue, y se expresó como porcentaje, considerando la fluorescencia del control como el 100%. Finalmente, la inhibición fue expresada al restar al 100% la viabilidad. Los datos representan la media de 3 experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. *P significativa* valorando el resultado de la combinación con el tratamiento individual: I-CRP/ epirubicina.

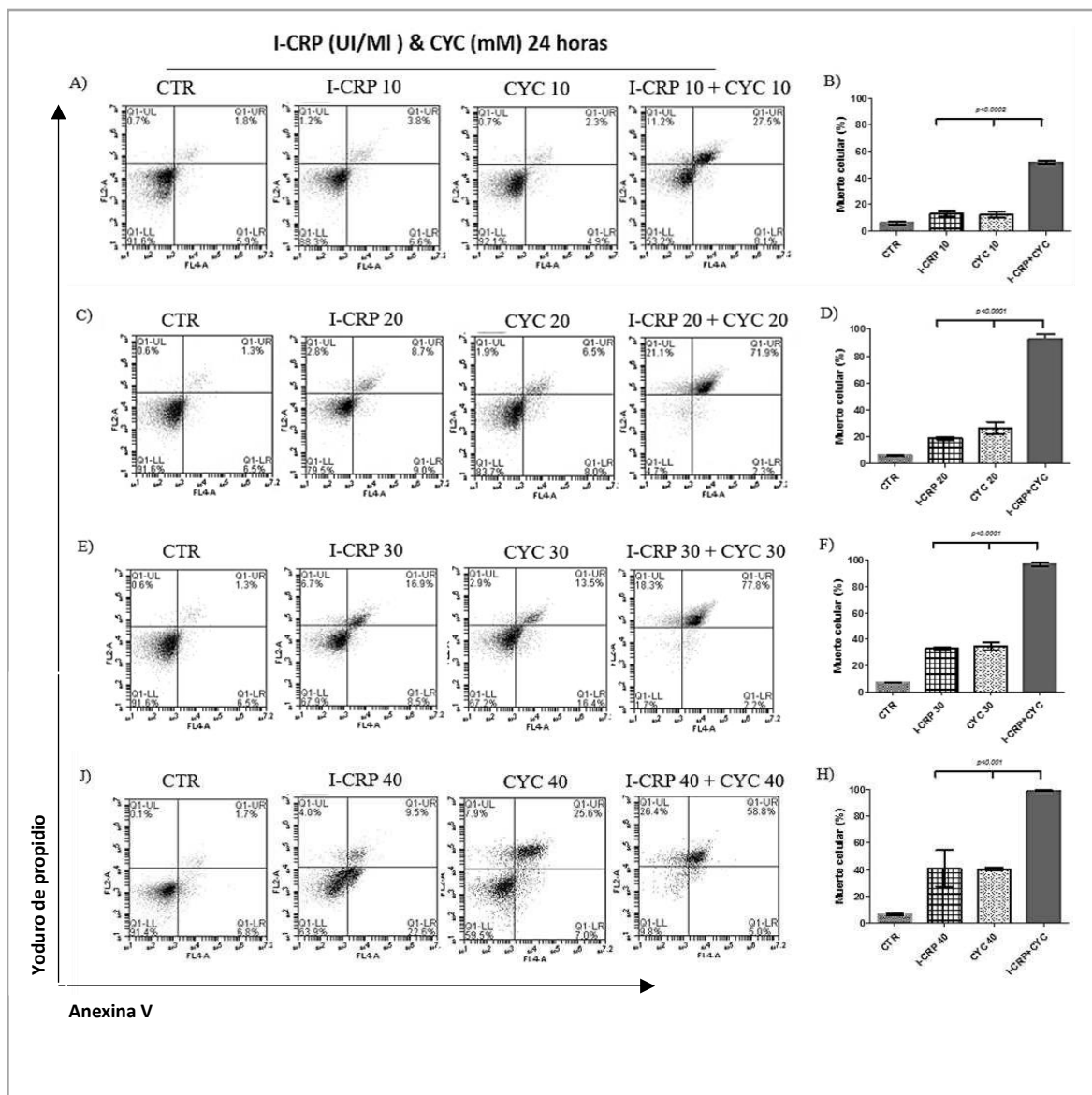


Figura 42. Dosis equipotentes de I-CRP y ciclofosfamida en combinación incrementan la muerte de células de cancer de mama MDA-MB-231. (A, C, E, G) Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se recolectaron y tiñeron las células con Ann/IP, para el análisis de muerte celular. Se muestran los histogramas representativos. (B, D, F, H) Los datos representan el correspondiente promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado \pm DE. ICRP/CYC CC_{10} =0.61UI/mL/ 17.96 mM; CC_{20} =0.97UI/mL/ 22.46 mM; CC_{30} =1.01UI/mL/ 26.05 mM; CC_{40} =1.11UI/mL/ 28.76 mM.

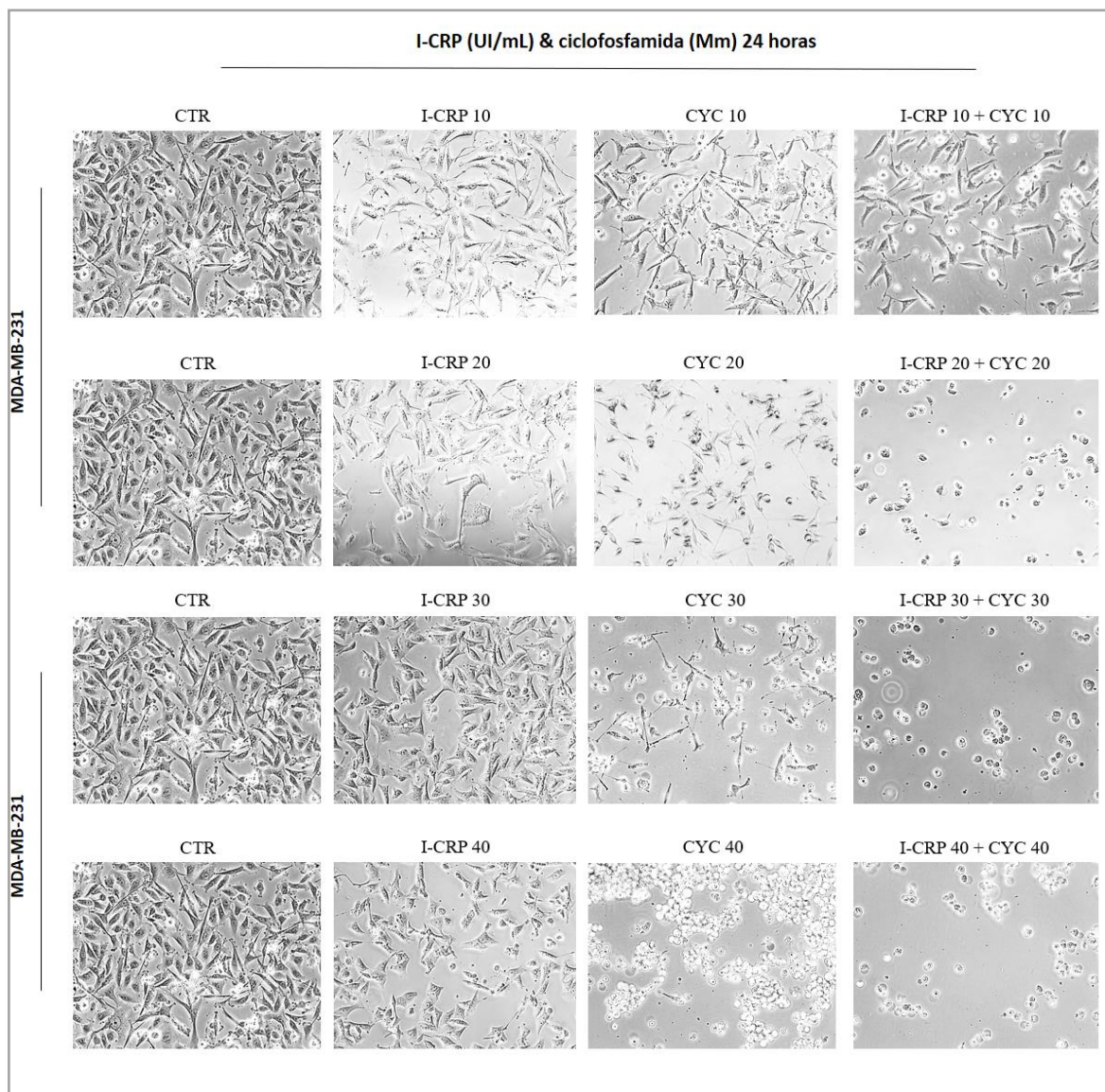


Figura 43. Morfología de muerte celular dada por el tratamiento combinado de I-CRP y ciclofosfamida a dosis equipotentes en células de cáncer de mama MDA-MB-231. Las células fueron tratadas con I-CRP y ciclofosfamida, durante 24 horas. Al finalizar, se tomaron microscopías de luz y la morfología de muerte celular fue analizada. Las micrografías de luz representativas de cada experimento son mostradas.

6. DISCUSIÓN

El cáncer de mama es una de las malignidades más comunes y más mortales en mujeres alrededor del mundo. En México, es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres, representando un grave problema de salud pública. El cáncer de mama “triple negativo” (TNBC), un subtipo agresivo de cáncer de mama, no cuenta con una terapia efectiva hoy en día, ya que las células tumorales desarrollan quimio-resistencia al único tratamiento existente. Se ha propuesto que la terapia combinacional pueda ofrecer algunas ventajas, como el uso de menores dosis de quimioterapia para lograr la misma pCR, sin producir efectos secundarios. Este trabajo tuvo como objetivo demostrar la efectividad de la terapia combinatoria de la quimioterapia más frecuentemente usada en cáncer de mama, ciclofosfamida y epirrubicina, con Immunepotent CRP, en la línea tumoral “triple negativo”, comparando su efecto con su contraparte triple positivo.

Los resultados muestran, por primera vez, el efecto antitumoral del I-CRP frente a la línea tumoral MDA-MB-231 “triple negativo”, sobre la cual ejerce una mayor reducción de la actividad metabólica y una mayor citotoxicidad, en comparación con su contraparte “triple positivo” MCF-7. Aunque anteriormente se conocía que el I-CRP tenía un efecto citotóxico y causaba la fragmentación del DNA de las células MCF-7 (Franco-Molina et al., 2006), en este trabajo se demostró, que el I-CRP, induce además, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, y que es por este mecanismo por el cual induce la citotoxicidad en células MCF-7. Esta misma dependencia a la producción de ROS se observó en la línea MDA-MB-231, además, la generación de ROS es significativamente mayor en éstas en comparación con las MCF-7, a dosis equipotentes. La mayor cantidad de ROS en células MDA-MB-231 es directamente proporcional a la muerte celular observada, explicando la mayor citotoxicidad sobre estas células en comparación con MCF-7.

Es posible que otros mecanismos, además del estrés oxidativo, estén involucrados en la citotoxicidad del I-CRP, ya que la inhibición de las ROS mediante el uso de precursores del glutatión (N-acetilcisteína), no logra inhibir por completo la muerte celular en ambas líneas tumorales por lo que otros mecanismos podrían activarse en ausencia de ROS. Esto

concuera con lo observado anteriormente por Franco-Molina et al., 2006 y Gamboa-Mendoza et al., 2008, donde demuestran que el I-CRP induce, además, la expresión de proteínas pro-apoptóticas TP53, Bag-1, c-Myc, Bax, Bcl2 and Bak; así como supresión de la unión al DNA de AP-1, contribuyendo con ello, a la activación de otros mecanismos de muerte que pudieran ser independientes de ROS. Aunque la mayor parte de la muerte celular observada en células MDA-MB-231, después del tratamiento con I-CRP se inhibe con NAC, aún queda un porcentaje de células cuya muerte no se vió inhibida, por lo que mayores estudios son necesarios para dilucidar la cascada de señalización completa de muerte celular regulada por el I-CRP en células MDA-MB-231 y MCF-7. Es importante notar que el papel de las ROS en la muerte celular inducida por el I-CRP se habían reportado anteriormente, por nuestro grupo de investigación, en células HeLa de cáncer cervicouterino (Martínez-Torres et al., 2018), esto permite remarcar que, a pesar de las diferencias entre distintas líneas tumorales humanas, el I-CRP parece utilizar el mismo mecanismo de acción, para inducir en mayor o menor medida su citotoxicidad o efecto antitumoral.

La similitud del mecanismo de acción antitumoral del I-CRP se corrobora al observar las micrografías de las células tratadas durante 24 hrs con I-CRP. En las células MCF-7, MDA-MB-231, y HeLa (observaciones no reportadas), se observa la formación de vacuolas al ser tratadas con la CC_{50} de I-CRP. En células HeLa y MCF-7 se demostró que estas vesículas son autofagosomas prosupervivencia (Tesis Karla Álvarez-Valadez); por otro lado, las células muertas muestran la membrana plasmática comprometida. La formación de autofagosomas cito-protectores también se ha documentado en células tumorales tratadas con epirubicina y ciclofosfamida (Sun et al., 2011; Lefort et al., 2014). Sin embargo, el estrés oxidativo puede sobrepasar la capacidad cito-protectora de los autofagosomas e inducir muerte celular (Štěrba et al., 2013). Esto parece estar pasando en el caso del tratamiento individual con I-CRP, ciclofosfamida y epirubicina en MCF-7, donde se observan por microscopia la formación de autofagosomas, al parecer como una probable limitante del potencial citotóxico de la terapia. Las combinaciones presentadas en este trabajo reducen visiblemente la formación de autofagosomas, al parecer debido a que las combinaciones de fármacos inductores de ROS sobrepasan el efecto citoprotector de los autogomas al estrés oxidativo, llevándolas a la muerte celular. Al contrario de

MCF-7, en MDA-MB-231 la formación de autofagosomas citoprotectores por los tratamientos no parece disminuir en algunas combinaciones realizadas, lo cual se asocia a los resultados no significativos en la muerte celular encontrados; esto quizás debido a una expresión constitutiva elevada de LC3B o número de autofagosomas por célula en MDA-MB-231, lo cual está asociado al índice alto de proliferación e invasión de esta línea tumoral de mal pronóstico (Lefort et al., 2014). Se ha observado que la inhibición de autofagosomas tempranos y tardíos incrementa la citotoxicidad del I-CRP (Tesis Karla Álvarez-Valadez); mientras que con ciclofosfamida, la inhibición de autofagosomas tempranos disminuye su citotoxicidad, y la formación de autofagosomas tardíos la incrementa (Dewaele et al., 2010). Estos resultados indican que los elementos encargados de la formación de autofagosomas tempranos podrían estar jugando un papel importante en el mecanismo de citotoxicidad inducida por esta quimioterapia. Sin embargo, el switch de cito-protección hacia citotoxicidad no se conoce aún, por lo que estudios futuros que indaguen este mecanismo deberían realizarse para poder entender mejor este proceso.

Uno de los aspectos principales de este trabajo fue estudiar el efecto de combinar diferentes dosis de I-CRP con ciclofosfamida o epirubicina (los cuales comparten un mecanismo citotóxico redox), para determinar las concentraciones que, en combinación, potenciaran la muerte de células de cáncer de mama. Así como también, determinar aquellas que pusieran en detrimento el efecto citotóxico de las quimioterapias. Los resultados mostraron que la epirubicina, en dosis cercanas a la IC_{50} , reduce, indiferentemente, la actividad metabólica en ambas líneas tumorales, teniendo un efecto general dosis-dependiente. Sin embargo, observamos, que tales concentraciones, inducen mayor muerte celular en MCF-7, que en MDA-MB-231, sugiriendo que la epirubicina induce en MDA-MB-231, un efecto probablemente citostático, concordando con la literatura, que indica que la epirubicina puede ejercer efectos tanto citotóxicos y como citostáticos sobre células tumorales (Chabner & Longo, 2011). Esto puede estar relacionado con las características intrínsecas de las propias células, por ejemplo las células MDA-MB-231 tienen un mayor índice mitótico (Eroles et al. 2012), por lo que tienen mayor probabilidad de sufrir un efecto citostático ante la epirubicina; además, de que éstas células tienen una mayor capacidad antioxidativa debido a su poco grado de diferenciación, que les confieren mayor resistencia al estrés oxidativo (Lefort et al., 2014).

Al combinar la EPI con concentraciones mínimas de I-CRP (IC_1), la reducción del metabolismo celular se incrementó sinérgicamente en células MCF-7 (**Fig. 18 A**), debido a un incremento en la muerte celular (**Fig. 20**). Por otro lado, en MDA-MB-231 en las dosis cercanas a la IC_{50} (epi), la adición de I-CRP (IC_1) no incrementó significativamente la reducción de la actividad metabólica (**Fig. 19**), pero sí la citotoxicidad de la quimioterapia, sugiriendo que mínimas concentraciones de I-CRP disminuyen el efecto citostático de la epirubicina e incrementan su citotoxicidad sobre MDA-MB-231 (**Fig. 7**), potenciando su efecto antitumoral en esta línea de pobre pronóstico (**Fig. 20**). El sinergismo del I-CRP (IC_1) con la epirubicina en ambas líneas celulares puede deberse a una potenciación de la muerte celular dependiente de ROS. La producción de ROS es uno de los principales mecanismos de muerte inducido por ambos agentes (Štěřba et al., 2013; Kurauchi et al., 2017). Sin embargo, estudios posteriores analizando la producción de ROS por las combinaciones son necesarios para evaluar si es efectivamente a causa de las ROS que ocurre una potenciación de la muerte celular.

Por otro lado, la combinación de concentraciones mínimas de epirubicina (IC_1) con dosis mayores de I-CRP no muestran diferencias significativas sobre la inhibición dada por el I-CRP en células MCF-7, a pesar de que su contribución sea clasificada como aditiva (**Fig. 21**); induciendo un incremento en la muerte no significativo generalmente. Lo anterior hace pensar que la adición de epirubicina (IC_1), a tal concentración, es insuficiente para incrementar el efecto citotóxico redox inducido por el I-CRP. Por el contrario, en MDA-MB-231, la epirubicina (IC_1) incrementa de manera sinérgica la reducción de la actividad metabólica dada por el I-CRP (**Fig. 22**), debido a un incremento significativo en la muerte celular, probablemente debido a la mayor sensibilidad de las células MDA-MB-231 al I-CRP. Estos resultados indican que la epirubicina incrementa el mecanismo antitumoral del I-CRP contra las células tumorales “triple-negativo”, que mostró mayor sensibilidad a las ROS, probablemente elevando el estrés oxidativo, cuyo umbral elevado sobrepasa la capacidad citoprotectora de los autofagosomas inducidos por el I-CRP. Esto es de suma importancia, ya que de comprobarse lo anterior, la combinación evitaría también la proliferación e invasividad dada por el proceso de autofagia (Lefort et al., 2014), al llevarla a la muerte celular. Esta combinación, propone la utilización del I-CRP, a una dosis mayor que la habitualmente otorgada en clínica.

Debido a las diferencias observadas entre ambas líneas celulares, se llevó a cabo la combinación de concentraciones equipotentes de I-CRP y epirubicina. Los resultados muestran un incremento significativo en la muerte celular, tanto en MCF-7 como en MDA-MB-231, en comparación con la citotoxicidad inducida por cada uno de los tratamientos por separado, observando una mayor respuesta citotóxica en MDA-MB-231 que en MCF-7. Las combinaciones equipotentes de ambos, por arriba de la IC_{60} , inducen muerte celular cercana al 100%. Estos resultados brindan una nueva opción terapéutica para la realización de pruebas clínicas con pacientes, sobre todo en aquellos pacientes con dificultad de continuar con el tratamiento debido a contraindicaciones en la salud por las altas dosis.

La ciclofosfamida, un agente alquilante del DNA, induce también un estrés oxidativo en la célula tumoral, cuya intensidad varía dependiendo de la línea celular (Kurauchi et al., 2017). Los resultados muestran que la ciclofosfamida reduce la actividad metabólica e incrementa la muerte celular en ambas líneas tumorales, siendo MCF-7 más sensible al efecto inhibitorio y citotóxico que MDA-MB-231, contrario a lo observado en la literatura (Eroles et al. 2012). Estas diferencias pueden deberse a las diferentes capacidades antioxidativas y proliferativas entre ambas líneas celulares (Eroles et al. 2012; Lefort et al. 2014).

Contrario a la combinación con epirubicina, el I-CRP (IC_1) no potencia sinérgicamente la actividad inhibitoria de la ciclofosfamida en las líneas tumorales de mama, sin embargo, no interfiere con el efecto antitumoral de éste, obteniendo un efecto aditivo (**Fig. 25 y 26**). Al analizar el efecto citotóxico, se observa que el I-CRP (IC_1) no incrementa tampoco la citotoxicidad de la ciclofosfamida en células MCF-7, antagonizándolo incluso, en el radio 1:40 (**Fig. 27 F**). Concluyendo que el I-CRP (IC_1) no sinergiza el estrés oxidativo, inducido de manera aguda por la ciclofosfamida, en MCF-7, como lo observado Chakraborty y col. en 2016, quien al utilizar otros compuestos redox en combinación ciclofosfamida, incrementaba la generación de ROS, y sensibilizaba a las células tumorales a una muerte por apoptosis, activando p53 y caspasa 3. Esto quizás debido a que la dosis de I-CRP empleada en esta combinación (IC_1 y CC_1), pueda ser insuficiente para inducir los cambios descritos anteriormente. Debido a lo observado en las

micrografías de luz (**Fig. 27 A, C, E, G**), el I-CRP (IC_1) pudiese estar incrementando el efecto citostático (y no el citotóxico) de la ciclofosfamida en MCF-7, correspondiendo esta conjetura a los resultados aditivos en la inhibición celular, ya que se observan un menor número de células deshaderidas, en comparación con las células tratadas únicamente con ciclofosfamida, al parecer quedando éstas en un estado de senescencia. Sin embargo, tales conjeturas requieren del posterior estudio del ciclo celular para comprobarlas.

Contrario a lo encontrado en MCF-7, en MDA-MB-231 la adición de I-CRP (IC_1) incrementa significativamente la muerte celular inducida por la ciclofosfamida, a pesar de la menor sensibilidad de las células MDA-MB-231 a la ciclofosfamida, en comparación con MCF-7. Esto quizás debido a que las células MDA-MB-231 son más sensibles al efecto citotóxico del I-CRP. Lo que permite concluir que dosis tan pequeñas como la CC_1 de I-CRP incrementa el estrés oxidativo y la muerte inducida por la ciclofosfamida en esta línea tumoral caracterizada por presentar mayor capacidad antioxidante (Lefort et al., 2014), mejorando la respuesta del único tratamiento existente contra este subtipo molecular de pobre pronóstico.

Por otro lado, concentraciones mínimas de ciclofosfamida (IC_1) incrementan siempre el efecto inhibitorio del I-CRP, teniendo en ambas líneas tumorales un efecto similar o aditivo, siendo ligeramente mayor en MCF-7, que en MDA-MB-231.

La adición de ciclofosfamida (IC_1) en MCF-7, incrementa significativamente la citotoxicidad del I-CRP, lo que pueda ser debido tanto a un incremento en la activación de genes pro-apoptóticos, como a una mayor producción de ROS, o ambos. El incremento en la producción de ROS por la adición ciclofosfamida (IC_1) pueda ser quizás una razón más probable, debido a la menor capacidad antioxidativa de las células MCF-7 (Ramanathan et al., 2005); y a lo observado a través de las microscopías de luz, donde la adición de ciclofosfamida (IC_1) inhibe por completo la formación de vacuolas por el I-CRP (comprobadas como autofagosomas en la tesis de Karla Álvarez-Valadez), lo que sugiere, además, una mayor sensibilidad a ROS debido a una disminución de la capacidad citoprotectora dada por los autofagosomas. Lo anterior se observa claramente en los

resultados, donde la adición de CYC (IC_1) permite que la CC_{50} del I-CRP induzca una muerte cercana al 100% (**Fig. 30 G, H**).

Por otro lado, la ciclofosfamida (IC_1) no incrementa significativamente la muerte inducida por el I-CRP en MDA-MB-231, sugiriendo la posibilidad de que la ciclofosfamida, a concentraciones tan bajas como la IC_1 , no sean suficientes para incrementar la producción de ROS dada por el I-CRP; o si la incrementa, no sean insuficientes para suprimir la expresión basal elevada de autofagosomas citoprotectores en esta línea tumoral (Lefort et al., 2014); ya que, por lo observado en las micrografías de luz, este quizás sea el caso, debido a que en MDA-MB-231, la CYC (IC_1) no induce un cambio considerable en el número de vacuolas (autofagosomas) inducidos por el I-CRP.

Por último, las combinaciones equipotentes de I-CRP y ciclofosfamida, incrementan siempre la muerte celular inducida por cada uno de los tratamientos por separado. Concentraciones tan mínimas como la CC_{30} , producen una muerte celular cercana al 100%, en ambas líneas tumorales. Esto quiere decir, que los resultados no significativos en la muerte celular encontradas anteriormente, al utilizar alguno de los medicamentos en concentraciones correspondientes a la CC_1 , era debido a una dosis insuficiente. Las micrografías de luz muestran una morfología de muerte celular que combina a la de ambos tratamientos, sugiriendo que la combinación de concentraciones equipotentes incrementa o suma el efecto redox de ambos, sobrepasando la capacidad antioxidativa y citoprotectora de ambas líneas tumorales, superando las diferencias moleculares entre ambas, llevándolas a la muerte celular. Esto se observa notablemente en la microscopia, con la disminución en el número de células por la combinación (**Fig. 31**). Tales conclusiones, no descartan la potenciación o participación de otros mecanismos de muerte celular; por lo que mayores estudios son necesarios para confirmarlo.

En este trabajo corroboré que el Immunepotent CRP, actualmente utilizado como adyuvante del sistema inmune en el tratamiento quimioterapéutico de pacientes con cáncer de mama, puede ser usado también como una sustancia antitumoral. Esto abre la posibilidad de nuevos esquemas de tratamiento, utilizando combinaciones en radios específicos, expuestos aquí, modificando las dosis del I-CRP antes empleada, sin perjudicar el efecto antitumoral de la quimioterapia, ya que se demostró no presentan

interacciones farmacológicas antagónicas. Cualesquiera de las combinaciones presentan un comparativo mejor resultado que la administración del fármaco sólo, sin embargo, administrar el I-CRP en combinación equipotente a la quimioterapia, logra siempre una pCR de las células tumorales *in vitro*, por lo que deben de considerarse prioritariamente para la implementación de un nuevo esquema de tratamiento *in vivo*. A diferencia de lo encontrado por otros autores (Soo et al., 2015; Agrawal et al., 2017; Ghanbari 2013; etc.), en este estudio se logra definir claramente el efecto sinérgico y aditivo, y además se brinda de manea cuantitativa el número de veces que las combinaciones logran reducir la quimioterapia.

Estos resultados abren una nueva rama de investigación, para probar el uso de estas combinaciones sinérgicas en clínica, sin embargo, recordando a *Galluzzi y cols.*, en 2012, los efectos terapéuticos de los mejores agentes anticancerosos se originan, en parte, de la elicitación de novo o la reactivación de una respuesta inmune existente. Por lo tanto, es de esperarse una respuesta diferente, probablemente una de mayor intensidad, ya que, como se ha observado previamente, el I-CRP tiene la capacidad de inducir también muerte inmunogénica en combinación con quimioterapia *in vivo* (Rodríguez-Salazar et al. 2017), mediante la generación de DAMPs (damage-associated molecular patterns). La visión del cáncer como una enfermedad puramente autónoma, lleva al 95% de los agentes seleccionados en fases preclínicas a un fallo en la obtención de una respuesta terapéutica robusta en fases clínicas I/II; estimulando, por lo tanto, el continuar esta investigación en un modelo *in vivo* inmunocompetente.

7. CONCLUSIONES

1. El IMMUNEPOTENT-CRP disminuye el metabolismo celular de MCF-7 y MDA-MB-231 ó “Triple-Negativo”, de manera dependiente de dosis.
2. El IMMUNEPOTENT-CRP induce la exposición de fosfatidilserina y la permeabilización de la membrana plasmática en MCF-7 y MDA-MB-231, de manera dependiente de dosis. Correlacionando la disminución en la actividad metabólica a un menor número de células debido al incremento en la muerte celular por el tratamiento.
3. El I-CRP induce la producción de especies reactivas de oxígeno y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, tanto en MCF-7 y MDA-MB-231. El uso del antioxidante N-acetilcisteína inhibe completamente la formación de ROS en MDA-MB-231; y en MCF-7, disminuye significativamente su formación, pero no completamente.
4. La inhibición de la formación de ROS inhibe la muerte inducida por el I-CRP en MDA-MB-231 “triple negativo”; y la disminuye significativamente en MCF-7.
5. La epirubicina disminuye la actividad metabólica en MCF-7 y MDA-MB-231, de manera dependiente de dosis, sin diferencias significativas en la IC₅₀; a dosis mayores a la IC₅₀, induce mayor inhibición en MDA-MB-231 que en MCF-7. La ciclofosfamida disminuye la actividad metabólica de MCF-7 y MDA-MB-231, de manera dosis-dependiente; siendo más sensible MCF-7.
6. La epirubicina induce un incremento en la exposición de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular en MCF-7 y MDA-MB-231, de manera dependiente de dosis, siendo MCF-7 más sensible a la CC₅₀ que MDA-MB-231; dosis mayores a la CC₅₀ no inducen diferencias significativas entre MCF-7 y MDA-MB-231. La inhibición dada por la ciclofosfamida en MCF-7 y MDA-MB-231 se correlaciona con un incremento en la muerte celular también.

7. El comportamiento biológico de las células MCF-7 y células MDA-MB-231 ante concentraciones crecientes de I-CRP, ciclofosfamida, y epirubicina, corresponden a curvas no rectas denominadas curvas dosis-respuesta sigmoidea, sigmoidea y sigmoidea plana, respectivamente; obtenidas mediante el software Compusyn, a través del cual se obtuvieron las concentraciones inhibitorias y citotóxicas.
8. La adición de I-CRP (IC_1) incrementa el efecto inhibitorio de la epirubicina en MCF-7 y MDA-MB-231, de manera sinérgica. La adición de epirubicina (IC_1) incrementa la inhibición dada por el I-CRP en MCF-7, de manera aditiva; y en MDA-MB-231, de manera sinérgica. La combinación de I-CRP & epirubicina a concentraciones equipotentes, logra sinergizar el efecto antitumoral (inhibitorio) de cada uno, tanto en MCF-7 y MDA-MB-231, debido a un incremento en la exposición de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular, normalizando la respuesta citotóxica en ambas líneas tumorales de cáncer de mama. La adición de I-CRP (IC_1) incrementa el efecto inhibitorio de la ciclofosfamida en MCF-7 y MDA-MB-231, de manera aditiva. La adición de ciclofosfamida (IC_1) incrementa la inhibición dada por el I-CRP en MCF-7 y MDA-MB-231, de manera aditiva. El efecto aditivo de ciclofosfamida (IC_1) en MCF-7 tratadas con I-CRP se debe a un incremento en la muerte celular; por el contrario, la inhibición aditiva dada por la ciclofosfamida (IC_1) en el tratamiento con I-CRP en MDA-MB-231 no es debido a un incremento en la exposición de fosfatidilserina o la permeabilidad de la membrana celular. La combinación de I-CRP y ciclofosfamida, induce un efecto general sinérgico sobre la inhibición de células MDA-MB-231.
9. El efecto sinérgico del I-CRP (IC_1) es debido a un incremento en la exposición de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana celular. El efecto aditivo de epirubicina (IC_1) en MCF-7 tratadas con I-CRP se debe a la exposición de fosfatidilserina y la permeabilidad de la membrana plasmática sólo en algunas combinaciones. El efecto sinérgico de epirubicina (IC_1) en MDA-MB-231 tratadas con I-CRP, se debe siempre a un incremento en la muerte celular. El efecto aditivo del I-CRP (IC_1) en MCF-7 tratadas con ciclofosfamida no se debe a un incremento

en la exposición de fosfatidilserina o la permeabilidad de la membrana celular; por el contrario, en MDA-MB-231, es debido a un incremento en la muerte celular. La combinación de I-CRP & ciclofosfamida a concentraciones equipotentes, normaliza la respuesta en la exposición de fosfatidilserina y la permeabilidad en la muerte celular entre ambas líneas tumorales, incrementando la muerte celular hasta un total de casi 100%, con concentraciones tan bajas como la CC₃₀.

8. PERSPECTIVAS

- Esta tesis abre paso al uso del I-CRP como una terapia combinatoria efectiva, para el combate del cáncer de mama, al establecer las bases de su sinergismo en combinación con la quimioterapia más frecuentemente utilizada en esta patología, brindando este efecto de manera cuantificable.
- Específicamente, brinda los radios que mejor ejercen este efecto tanto en células luminales A (MCF-7), como células “triple negativo” (MDA-MB-231). Lo que permitirá posteriormente trasladar tales radios a estudios clínicos en pacientes.
- Corroborar los resultados de los radios sinérgicos y aditivos en un modelo *in vivo*.
- Estudiar y corroborar el posible mecanismo de muerte celular sugerido en la discusión, por el cual se ejerce un efecto sinérgico o aditivo en la terapia combinatoria.
- Incrementar las dosis de I-CRP aplicadas en clínica actualmente, valorando el efecto que tendrán tanto el tumor como en la cuenta de linfocitos.
- Debido a los resultados aquí presentados, es de suma importancia estudiar la relación del I-CRP con cada quimioterapia aplicada en las distintas enfermedades por cáncer.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. et al., 2017. Insulin-induced enhancement of MCF-7 breast cancer cell response to 5-fluorouracil and cyclophosphamide. *Tumor Biology*, 39(6).
- Albain, K. et al., 2010. Prognostic and Predictive Value of the 21-Gene Recurrence Score Assay in a Randomized Trial of Chemotherapy for Postmenopausal, Node-Positive, Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Lancet Oncology*, 11(1), pp.55–65.
- Andreetta, C. et al., 2010. First-line chemotherapy with or without biologic agents for metastatic breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 76(2), pp.99–111. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.01.007>.
- Bray, F. et al., 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International Journal of Cancer*, 132(5), pp.1133–1145. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.27711> [Accessed March 3, 2018].
- Bruce A. Chabner, Philip C. Amrein, Brian J. Druker, M.D.M., Constantine S. Mitsiades, Paul E. Goss, David P. Ryan, S.R. & Paul G. Richardson, Jeffrey G. Supko, W.H.W., 2006. Chemotherapy of Neoplastic Diseases. In B. L. L. ;Laz. J. S. . P. K. L., ed. *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11e*. McGraw-Hill Professional, pp. 1315–1389. Available at: http://doi.contentdirections.com/mr/mgh_biblio.jsp?doi=10.1036/0071422803.
- Cen, J. et al., 2016. Long-Term Alteration of Reactive Oxygen Species Led to Multidrug Resistance in MCF-7 Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Chabner, B. & Longo, D.L. eds., 2011. *Cancer chemotherapy and biotherapy: principles and practice* 5th ed., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Chakraborty, P. et al., 2016. Sensitization of cancer cells to cyclophosphamide therapy by an organoselenium compound through ROS-mediated apoptosis. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, pp.1992–1999. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.006>.
- Chou, T., 2007. Theoretical Basis , Experimental Design , and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies □.
- Chou, T.-C., 1976. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *Journal of Theoretical Biology*, 59(2), pp.253–254.
- Chou, T.-C. & Talalay, P., 1983. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends in Pharmacological Sciences*, 4, pp.450–454.
- Chou, T.-C. & Talalay, P., 1981. Generalized Equations for the Analysis of Inhibitions

- of Michaelis-Menten and Higher-Order Kinetic Systems with Two or More Mutually Exclusive and Nonexclusive Inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 115(1), pp.207–216.
- Chou, T.-C. & Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, 22, pp.27–55.
- Corben, A.D., 2013. Pathology of Invasive Breast Disease. *Surgical Clinics of NA*, 93, pp.363–392. Available at: <https://miami.pure.elsevier.com/en/publications/diseases-of-the-breast-fifth-edition> [Accessed March 4, 2018].
- Coronado-Cerda, E.E. et al., 2016. In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil. *Journal of Immunology Research*, 2016, pp.1–10. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2016/6942321/> [Accessed June 4, 2016].
- Dabbs, D.J., 2014. *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications* Fourth edi., Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. Available at: <http://www.gbv.de/dms/bowker/toc/9781455744619.pdf>.
- Dewaele, M., Maes, H. & Agostinis, P., 2010. ROS-mediated mechanisms of autophagy stimulation and their relevance in cancer therapy. *Autophagy*, 6(7), pp.838–854.
- Dowsett, M. et al., 2013. Comparison of PAM50 Risk of Recurrence Score With Onco type DX and IHC4 for Predicting Risk of Distant Recurrence After Endocrine Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 31(22), pp.2783–2790. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23816962> [Accessed March 5, 2018].
- Emadi, A., Jones, R.J. & Brodsky, R.A., 2009. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(11), pp.638–647. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrclinonc.2009.146> [Accessed October 21, 2016].
- Eroles, P. et al., 2012. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), pp.698–707.
- Fehm, T. et al., 2004. Prognostic significance of serum HER2 and CA 15-3 at the time of diagnosis of metastatic breast cancer. *Anticancer research*, 24(3b), pp.1987–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15274389> [Accessed April 19, 2018].
- Ferlay, J. et al., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), pp.E359-86. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.29210> [Accessed March 3, 2018].
- Franco-Molina, M.A. et al., 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32(4), pp.637–646.

- Franco-Molina, M.A. et al., 2008. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*, 10(5), pp.490–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1465324908702020> [Accessed May 20, 2016].
- Franco-Molina, M.A. et al., 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*, 8(4), pp.408–414. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1465324906708921> [Accessed May 20, 2016].
- Ghanbari, S.D.A., 2013. Tranilast enhances the anti-tumor effects of tamoxifen on human breast cancer cells in vitro. *Journal of biomedical science*, 20(76), pp.131–141. Available at: <http://www.jbiomedsci.com/content/20/1/89>.
- Group, C., 1998. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet (London, England)*, 352(9132), pp.930–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9752815> [Accessed March 5, 2018].
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> [Accessed April 18, 2018].
- Harris, L. et al., 2007. American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(33), pp.5287–5312. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17954709> [Accessed March 5, 2018].
- Houot, R. et al., 2015. T-cell-based Immunotherapy: Adoptive Cell Transfer and Checkpoint Inhibition. *Cancer Immunology Research*, 3(10), pp.1115–1122. Available at: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-15-0190>.
- Kenny, P.A. et al., 2007. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Molecular Oncology*, 1(1), pp.84–96.
- Kirkpatrick, C.H., Rich, R.R. & Smith, T.K., 1972. Effect of transfer factor on lymphocyte function in anergic patients. *The Journal of clinical investigation*, 51(11), pp.2948–2958. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5080419> [Accessed March 11, 2018].
- Kumar, V., Fausto, N. & A., A., 2008. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. *Elsevier, Burlington, MA*, ed. 7, pp.256–340.
- Kurauchi, K. et al., 2017. Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. *BMC Research Notes*, 10(1), pp.1–10.
- LARA, H.H. et al., 2010. Clinical and immunological assessment in breast cancer patients receiving anticancer therapy and bovine dialyzable leukocyte extract as an

- adjuvant. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(3), pp.425–431. Available at: https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm_00000066 [Accessed April 18, 2018].
- Lawrence, H.S. & Borkowsky, W., 1983. A new basis for the immunoregulatory activities of transfer factor—An arcane dialect in the language of cells. *Cellular Immunology*, 82(1), pp.102–116. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0008874983901454> [Accessed June 4, 2016].
- Lefort, S. et al., 2014. Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy*, 10(12), pp.2122–2142.
- Lewis, J.P., 2007. An interpretation of the EBCTCG data. *The oncologist*, 12(5), pp.505–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522235> [Accessed March 5, 2018].
- Li, C.I., Uribe, D.J. & Daling, J.R., 2005. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *British Journal of Cancer*, 93(9), pp.1046–1052.
- Liu, J.J. et al., 1984. Effects of long-term treatment of mice with anti-I-J monoclonal antibody and dialyzable leukocyte extract on immune function and lifespan. *Mechanisms of Ageing and Development*, 27(3), pp.359–372. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0047637484900587> [Accessed March 5, 2018].
- Martínez-Torres, A.C. et al., 2018. IMMUNEPOTENT CRP induces cell cycle arrest and caspase-independent regulated cell death in HeLa cells through reactive oxygen species production. *BMC Cancer*, 18(1), p.13. Available at: <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12885-017-3954-5> [Accessed March 5, 2018].
- Medina-Rivero, E. et al., 2014. Batch-to-batch reproducibility of Transferon™. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, pp.289–294. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708513004299> [Accessed March 11, 2018].
- Mendoza-Gamboa, E. et al., 2008. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates AP-1 DNA-binding activity and nuclear transcription factor expression in MCF-7 breast cancer cells. *Cytotherapy*, 10(2), pp.212–219. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18368600>.
- Mendoza-Gamboa, E. et al., 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*, 8(4), pp.408–414.
- Miller, K.D. et al., 2016. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. CA: A Cancer Journal for Clinicians. Available at: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21349> [Accessed June 4, 2016].

Mitchell RN. 2015. Neoplasia. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. ElSevier Inc: Nueva York, pp: 256- 340.

Musolino, A. et al., 2018. Abstract OT1-03-03: Phase II, open label, randomized, biomarker study of immune-mediated mechanism of action of neoadjuvant subcutaneous trastuzumab in patients with operable or locally advanced/Inflammatory HER2-positive breast cancer. ImmunHER trial on behalf of the Gruppo Oncologico Italiano di Ricerca Clinica (GOIRC). *Cancer Research*, 78(4 Supplement), p.OT1-03-03-OT1-03-03. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1538-7445.SABCS17-OT1-03-03> [Accessed March 10, 2018].

Myers Jr, C.E. & Chabner, B.A., 1990. *Cancer chemotherapy: principles and practice* 5th ed. B. Chabner & D. L. Longo, eds., Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology Breast Cancer Risk Reduction. Vol. 2018.

O'Brien, J. et al., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267(17), pp.5421–5426. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10951200>.

O'Brien, K.M. et al., 2010. Intrinsic Breast Tumor Subtypes, Race, and Long-Term Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Clinical Cancer Research*, 16(24), pp.6100–6110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21169259> [Accessed March 4, 2018].

Paik, S. et al., 2006. Gene Expression and Benefit of Chemotherapy in Women With Node-Negative, Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(23), pp.3726–3734. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16720680> [Accessed March 5, 2018].

Parker, J.S. et al., 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), pp.1160–1167.

Perou, C.M. et al., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), pp.747–752. Available at: <http://www.nature.com/articles/35021093> [Accessed April 18, 2018].

Rakoff-Nahoum, S., 2006. Why cancer and inflammation? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 79(3–4), pp.123–130.

Ramanathan, B. et al., 2005. Resistance to paclitaxel is proportional to cellular total antioxidant capacity. *Cancer Research*, 65(18), pp.8455–8460. Available at: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-1162> [Accessed March 12, 2018].

- Rizo-Ríos, P. et al., 2015. Trends in cancer mortality in Mexico: 1990–2012. *Revista Médica Del Hospital General De México*, 78(2), pp.85–94. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0185106315000293> [Accessed May 5, 2016].
- Rizo, P. et al., 2015. Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evidencia Médica e Investigación en salud*, 8, pp.5–15.
- Rodríguez-Salazar, M.D.C. et al., 2017. The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology Letters*, 14(1), pp.844–852. Available at: <https://www.spandidos-publications.com/ol/14/1/844?text=fulltext> [Accessed March 16, 2018].
- Salud, S. De, 2009. Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Mama en Segundo y Tercer nivel de Atención GUÍA DE PRÁCTICA CLÍNICA gpc. *CENETEC, IMSS-232-09*, p.103. Available at: http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/232_IMSS_09_Ca_Mama_2oN/EyR_IMSS_232_09.pdf [Accessed March 4, 2018].
- Singh, N. et al., 2009. Caspase Mediated Enhanced Apoptotic Action of Cyclophosphamide- and Resveratrol-Treated MCF-7 Cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109(4), pp.473–485. Available at: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jphs/08173FP?from=CrossRef> [Accessed March 5, 2018].
- Soo, J.S.S. et al., 2015. Metformin synergizes 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) combination therapy through impairing intracellular ATP production and DNA repair in breast cancer stem cells. *Apoptosis*, 20(10), pp.1373–1387.
- Štěrbá, M. et al., 2013. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(8), pp.899–929. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4795>.
- Subik, K. et al., 2010. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, 4, pp.35–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20697531>.
- Sulkowska, M. et al., 1998. Cyclophosphamide-induced generation of reactive oxygen species . Comparison with morphological changes in type II alveolar epithelial cells and lung capillaries. , 50, pp.209–220.
- Sun, W.L. et al., 2011. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. *Autophagy*, 7(9), pp.1035–1044.
- Tallarida, R.J., 2002. The interaction index: a measure of drug synergism. *Pain*, 98,

pp.163–168.

Van 't Veer, L.J. et al., 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), pp.530–536. Available at: <http://www.nature.com/articles/415530a> [Accessed April 19, 2018].

“RESUMEN BIBLIOGRÁFICO”

Olga Liliana Guzmá Aguillón

Candidato para el Grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Inmunología

Tesis: ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL
IMMUNEPOTENT CRP® EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE
MAMA Y SU EFECTO EN COMBINACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA
O EPIRUBICINA

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Montemorelos, Nuevo León, el 23 de octubre de 1987, hija de Francisco Martín Guzmán Garza y Olga Lydia Aguillón López.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Cirujano y Partero en 2011.

Experiencia Profesional: Médico investigador en la clínica de Inmunología y Virología, UANL.

Trabajo presentado en el: “VI CONGRESO DE LA RAMA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES”, modalidad Cartel, los días 22 al 25 de octubre de 2017, en Puerto Vallarta, Jalisco, México.

Transducción de Señales

Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.



Se otorga la presente

C O N S T A N C I A a

Olga Liliana Guzmán Aguillón

Quien asistió y presentó el trabajo:

Bovine dializable leukocyte extract synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells in vitro

Por:

Olga Liliana Guzmán-Aguillón, Karla María Álvarez Valadez, Ana Carolina Martínez-Torres, Cristina Rodríguez-Padilla.

En la modalidad de presentación cartel en el

VI Congreso de la Rama de Transducción de Señales del 22 al 25 de octubre de 2017, Puerto Vallarta, Jal.

Atentamente
Comité Organizador

Dr. J. Alberto Olivares Reyes

Dr. J. Antonio Arias Montaña

Dr. Luis Vaca Domínguez